

DIE BESTIMMUNG DER NICHT PROTEINGEBUNDENEN
CLOFIBRINSÄUREFRAKTION DES MENSCHLICHEN
SERUMS ZUR THERAPIEÜBERWACHUNG

Wolfgang Merk

1981

Aus der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern,
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Die Bestimmung der nicht proteingebundenen Clofibrinsäure-
fraktion des menschlichen Serums zur Therapieüberwachung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Merk

aus
Germering

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Schwandt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1981



Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. P. Schwandt in der Zeit von November 1977 bis Dezember 1978 an der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, der Universität München (damals: Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Karl) durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich danken

Herrn Prof. Dr. med. G. Paumgartner, Direktor der Medizinischen Klinik II, Klinikum Großhadern, der Universität München, für die Übernahme der Mitberichterstattung,

Herrn Prof. Dr. med. P. Schwandt für die Überlassung des Themas und die vielseitigen Anregungen, sowie für die Ermöglichung der Untersuchungen in den Laboratorien des Klinikums. Vielen Dank auch seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei der Arbeit.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

Einleitung

Störungen bei Aufnahme, Verteilung oder Ausscheidung von Clofibrinsäure, die zu Konzentrationsänderungen im Serum führen.

Bisherige Untersuchungen

Methoden

1. Gaschromatographie
 - a) Extraktion der Clofibrinsäure aus den Proben
 - b) Quantitative Messung
2. Gleichgewichtsdialyse
 - a) Möglichkeiten, die freie Clofibrinsäure zu separieren
 - b) Die verwendete Methode

Ergebnisse der in vitro-Vorversuche zur Gleichgewichtsdialyse

1. Membranbindung
2. Einstellung des Gleichgewichts in Abhängigkeit von der Zeit
3. Beziehung der freien Clofibrinsäuremenge zum eingesetzten Puffervolumen
4. Konzentrationsabhängigkeit der Clofibrinsäure-Albuminbindung

Ergebnisse

1. Zeitkinetiken
2. Gesamte und freie Clofibrinsäurekonzentrationen im Vergleich mit den Spiegeln anderer Serumbestandteile

- a) Untersuchte Patienten und erhaltene Clofibrin-säurewerte
- b) Freie und gesamte Clofibrinsäure
- c) Albumin
- d) Kreatinin
- e) Plasmalipide: Triglyceride, Cholesterin, Phospholipide
- f) Nierengesunde Patienten und Diabetiker

Diskussion

Zusammenfassung

Verwendete Chemikalien

Literaturverzeichnis

E i n l e i t u n g

Die Clofibrinsäure (CPIB = Chlorphenoxybutyrat), ein Hypolipidämikum, wird in veresterter Form als Clofibrat (Chlorphenoxyisobuttersäureäthylester) per os eingenommen. Die Äthylgruppe wird im Darm und im Plasma durch Gewebs- und Serumesterasen zum größten Teil abgespalten (23), so daß im Blut praktisch nur der wirksame Metabolit Clofibrinsäure vorliegt. Dieser ist zu einem hohen Prozentsatz an das Plasmaalbumin gebunden. Eine Bindung der Clofibrinsäure an die Lipoproteine VLDL, LDL und HDL ist, wie Beaumont und Dachet 1976 (2) gezeigt haben, nicht nachweisbar.

Die Pharmakologie geht heute davon aus, daß nur der kleine freie Anteil therapeutisch wirksam ist (10). Um einen bestimmten Wirkspiegel zu erhalten, muß eine viel höhere Dosis gegeben werden als bei ungebundenen Pharmaka, da das Depot der Albuminbindungsstellen mit aufgefüllt wird. Ändern sich die Eiweißbindungsverhältnisse bzw. ist bei Therapiebeginn ein verringertes Bindungsvermögen unbekannt, so können sich Konzentrationen des freien Medikaments ergeben, die ein Mehrfaches der erforderlichen ausmachen. Es treten sodann die toxischen Wirkungen des freien Anteils in den Vordergrund. Zu ihrer Vermeidung ist deshalb dessen Kontrolle notwendig, besonders bei sogenannten "Problem-Patienten", bei denen infolge sonstiger gesundheitlicher Störungen oder wegen der Wirkung anderer Medika-

mente die Aufnahme, Verteilung oder Ausscheidung des CPIB abnorm verlaufen.

Die Kontrolle erfolgt durch Messung des CPIB-Spiegels. Die Messung der Gesamtclofibrinsäure allein liefert aber oftmals keine aussagekräftigen und therapeutisch verwertbaren Ergebnisse (10, 7).

Gugler u. a. (10) zum Beispiel beschrieben die Clofibrattherapie bei 6 Patienten mit nephrotischem Syndrom. Die Plasmaalbuminkonzentrationen waren 3 g/ 100 ml oder geringer, die Proteinurie höher als 3 g/ 24 h. Die Kreatinin-Clearance betrug über 50 ml/ min, die Leberfunktion war nicht beeinträchtigt. 2 Patienten erhielten zweimal täglich 1 g Clofibrat als Dauerbehandlung, 4 nur für 14 Tage. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe war die Plasmaproteinbindung von 96,4 auf 88,8 % vermindert. In beiden Gruppen waren die CPIB- und CPIB-Glucuronid-Ausscheidung im Urin nicht signifikant verschieden. Dennoch waren bei den Patienten mit nephrotischem Syndrom die Gesamtclofibrinsäurespiegel auf fast ein Drittel der normalen verringert. Dadurch blieben die absoluten Konzentrationen des ungebundenen CPIB im erwünschten, therapeutischen Rahmen. Bei diesen nach mehreren Parametern selektierten Patienten mit noch normaler Leberfunktion und Kreatinin-Clearance ergab sich somit nicht die Notwendigkeit, die Dosis zu verändern.

Dobbelstein u. a. (7) fanden im Gegensatz dazu bei 14 Patienten mit nephrotischem Syndrom entsprechender Ausprä-

gung keine Erniedrigung der CPIB-Gesamtkonzentration im Serum. Die Werte lagen unabhängig vom Serumalbumin im Bereich derer des Normalkollektivs.

Bridgman u. a. (4) untersuchten ebenfalls 6 Patienten mit nephrotischem Syndrom und beschrieben bei Tagesdosen von 2 g (1 Patient nur 1 g/ d) Clofibrat bei 5 der Patienten toxische Nebenwirkungen der Clofibrinsäure aufgrund der veränderten Bindungsverhältnisse. Es traten myalgische Symptome mit Steifheit und Schwäche der Gliedmaßen und des Rückens mit gleichzeitigem Anstieg der Werte der Kreatinkinase und der Transaminasen auf. Die Serumalbuminkonzentration war bei 5 Patienten kleiner als 3 g/ 100 ml, bei einem 4 g/ 100 ml. Alle 6 schieden mehr als 3 g Protein/ 24 h im Urin aus (zwischen 5 und 14 g/ 24 h). Zweimal war die Kreatinin-Clearance größer als 50 ml/ min. In einem Fall traten trotz der Erfüllung aller von Gugler geforderten Bedingungen Beschwerden im unteren Teil des Rückens und Krämpfe in beiden Oberschenkeln auf bei einer Dosierung von 2 g Clofibrat/ d. Bei 4 Patienten und einer Kontrollgruppe ergab die Messung der freien und der Gesamtclofibrinsäurekonzentrationen nach Gabe von 1 x 1 g Clofibrat eine Erhöhung des ungebundenen Serumclofibrinsäureanteils von normal zwischen 3,1 und 8,2 % auf 21 bis 25 % in 3 der Fälle, der 4. Wert war 3,4 %. Die Gesamtkonzentrationen waren nicht erhöht, sondern sogar um etwa 25 % gesenkt, obwohl die Gesamtausscheidung im Urin von normal 70 % bei 3 Patienten auf 30 % vermindert und ins-

gesamt verzögert war.

Somit stellt sich die Frage, ob die Bestimmung des freien CPIB - absolut oder in Prozenten des Gesamtspiegels als Ausdruck für die Bindungsverhältnisse - vorteilhafter für die Therapieüberwachung sei. Hierzu liegen jedoch noch keine Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen vor; einige Autoren haben sich - wie später noch dargelegt - mit der Bindung der Clofibrinsäure an Albumin beschäftigt, so Thorp u. a. (23) bei Versuchen mit Rhesusaffen, Beaumont u. a. in vitro, Wain (24) in einer unveröffentlichten Arbeit und Connor u. a. (5) indirekt durch Speichel-Serumkonzentrationenvergleich.

Das Bedürfnis, eine Routine-Methode zur Clofibrat-Therapieüberwachung von "Problempatienten" zur Verfügung zu haben, machte es erforderlich, ein relativ schnelles und einfaches Verfahren zu finden und Normalwerte der freien Clofibrinsäure bzw. Abweichungen davon in Abhängigkeit von verschiedenen Serumparametern bei einer größeren Zahl von Patienten festzustellen.

Für diese Zwecke eignete sich am besten die Kombination der den physiologischen Bedingungen am nächsten kommenden Gleichgewichtsdialyse mit der sehr empfindlichen und genauen Gaschromatographie.

Es wurden zunächst Kinetiken für das Verhalten der freien und der gesamten Clofibrinsäure zu Beginn einer Standardtherapie bei nierengesunden Patienten erstellt. Außerdem wurde das Verhalten der Clofibrinsäurespiegel in Ab-

hängigkeit von Serumwerten, die besonders bei Nierenkranken verändert sind, bei 48 Patienten untersucht. Weitere Kinetiken konnten nicht mehr erstellt und weitere Untersuchungen nierenkranker Patienten in dem gewünschten Umfang nicht mehr durchgeführt werden, weil gerade während der Untersuchungen die Zulassung für Clofibrat durch das Bundesgesundheitsamt vorläufig widerrufen wurde.

Ursachen der Störungen bei Aufnahme, Verteilung oder Ausscheidung von CPIB:

Jede Verschiebung im Kreislauf eines Pharmakons kann neben physiologischen individuellen Schwankungen der Empfindlichkeit zu mangelnder Wirksamkeit oder zu Unverträglichkeit durch Veränderung der wirksamen Plasmakonzentrationen führen. So vermindern Störungen der Resorption im Darm oder die dauernde Einnahme von Laxantien die Aufnahme. Der Plasmaspiegel ist erniedrigt. Bei der Verteilung im Organismus - die Clofibrinsäure verteilt sich im Plasma und in der Extrazellulärflüssigkeit (23) - kann die Anzahl der freien zur Verfügung stehenden Bindungsstellen des Albumins verringert sein. Dies ist sowohl beim nephrotischen Syndrom der Fall, bei dem die Albuminkonzentration insgesamt verringert ist, als auch bei kompetitiver Besetzung der Bindungsstellen mit anderen Pharmaka oder endogenen Metaboliten. Hierbei kommen bekanntermaßen die ebenfalls stark albumingebundenen Medikamente

Phenylbutazon, orale Antikoagulantien, d-Thyroxin, Allopurinol, Disulfiram, die Sulfonylharnstoffe u. a. in Betracht. Ebenso ist diese Interferenz für die Diuretika Furosemid (4, 10) und Bendrofluazide (4) in vitro nachgewiesen. Bei Niereninsuffizienz nimmt der freie Anteil saurer Medikamente über die verminderte Ausscheidung hinaus zu; bei Urämie und Ansammlung von Reststickstoff (Azotämie) ist nämlich ein Teil der Albuminbindungsstellen durch endogene organische Säuren, die nicht dialysierbar sind, an Aktivkohle aber adsorbieren, besetzt (16). Die Autoren sind sich nicht einig, ob es sich hier um nicht veresterte Fettsäuren handelt (8, 16). Die Elimination, die über die Nieren erfolgt (23), ist wiederum von der Nierenfunktion, wahrscheinlich aber nicht vom pH-Wert des Glomerulumfiltrates abhängig (11). Eine Abbaustörung im Bereich der Leber - die Clofibrinsäure wird normalerweise zu 92 bis 98 % glukuronidiert -, z.B. bei Leberzirrhose (10, 17), oder eine erhöhte Oxidation in den Lebermikrosomen, z.B. durch das Spironolacton (10), beeinflussen ebenfalls die Ausscheidung.

Bisherige Untersuchungen:

Wie bereits erwähnt, liegen zur Bestimmung der freien Clofibrinsäure noch keine Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen vor. Dies hat folgende Ursachen:

Es müssen zwei Methoden kombiniert werden, die teilweise

recht material- und zeitaufwendig sein können, zum einen die Gewinnung der freien Clofibrinsäure durch schonende Abtrennung der Plasmaproteine ohne Denaturierung des Albumins, zum anderen die Extraktion der Clofibrinsäure ohne große Verluste zur quantitativen Bestimmung. Es soll gleichzeitig eine Meßmethode zur Verfügung stehen, die nicht nur für die Gesamtbestimmung, sondern auch für die Bestimmung des freien Anteils reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dieses Problem konnte teilweise nur durch Zusatz radioaktiv markierter Clofibrinsäure gelöst werden. Im einzelnen beschäftigen sich folgende Autoren mit der Messung der gesamten und der freien Clofibrinsäure bzw. mit der prozentualen Bindung der Clofibrinsäure an das Albumin:

1. J.M. Thorp, B.Sc. W'srand, 1962 (23):

Die Gleichgewichtsdialyse ergab, daß 4%iges Rinderserumalbumin CPIB zu 96 % bindet bei einer Gesamtkonzentration von 200 µg/ ml CPIB. Es liegen keine weiteren Angaben zur Gleichgewichtsdialyse und zur Bestimmung der freien Clofibrinsäure vor. Die Gesamtclofibrinsäurekonzentrationen wurden an Versuchstieren (Affen und Ratten) und an vier freiwilligen Probanden mit dem UV-Absorptionsspektrometer bestimmt.

2. R. Gugler, D.W. Shoeman u.a., 1975 (10):

Es wurden 6 Patienten mit nephrotischem Syndrom, sekundärer Hypoalbuminämie (≤ 3 g %), Proteinurie (> 3 g/ 24 h), jedoch normaler Leberfunktion und einer Kreatinin-Clearance ≥ 50 ml/ min und 6 Kontrollpersonen für mindestens 14 Tage mit Clofibrat behandelt.

Es zeigte sich, daß der freie CPIB-Anteil im Plasma im Vergleich zu den Kontrollwerten um ungefähr das Dreifache erhöht (von 3,6 % auf 11,2 %), gleichzeitig die Gesamtkonzentration auf ein Drittel der Normalwerte erniedrigt war (von ca. 135 auf 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die absolute freie CPIB-Konzentration blieb somit gleich hoch wie bei den gesunden Probanden ($5,1 \pm 0,6 \mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. $4,7 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$). Die Gesamtclofibrinsäurekonzentration wurde gaschromatographisch bestimmt. Die angewendete Methode hatte, wie der Autor 1976 bestätigte (9), vier Nachteile:

1. Der interne Standard CPIB-Ester wurde nicht zu Beginn zugesetzt. CPIB-Verluste bei der Extraktion blieben unbemerkt.
2. Der interne Standard ist leicht hydrolysierbar. Es entsteht dabei zusätzlich CPIB.
3. Die Methode läßt bei einem Variationskoeffizienten von 9,0 % nur Messungen von mindestens 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Plasma zu.
4. Die Bestimmung ist zeitaufwendig.

Auch die Gleichgewichtsdialyse (11), mit der die freie Clofibrinsäure gewonnen wurde, benötigt für die Äquilibrierung relativ viel Zeit (12-16 Stunden). Dies ist durch die großen Kammervolumina bedingt; 2 ml Plasma werden bei 37 ° C gegen 10 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,4) dialysiert.

3. J.L. Beaumont, C. Dachet, 1976 (2) :

Es handelt sich hier um eine in vitro-Bindungsstudie mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse. Untersucht wurde die Bindung des CPIB und des CPIB-Äthylesters an Albumin und die Lipoproteine. Die Clofibrinsäure, die an dieser Stelle interessiert, band sich nicht an die Lipo-

proteine, wie schon oben erwähnt; die Bindung an Albumin war reversibel. Es wurden jeweils die Albumin- in der einen und die CPIB-Konzentrationen in der anderen Kammer variiert. Dabei nahm bei ansteigender CPIB-Konzentration im 0,2 M NaK-Phosphatpuffer (pH 7,3) die prozentuale Bindung an das Albumin ab. Die CPIB-Konzentration betrug bis zu 680 μ M (dies entspricht ungefähr 180 μ g/ ml und dem therapeutischen Bereich), die Albuminkonzentration zwischen 0,5 und 5 g/ l (dies entspricht ungefähr 0,1 bis 0,01 der Serumkonzentration von ca. 5 g/ 100 ml). Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich daher nur teilweise auf physiologische Bedingungen übertragen. Das Gleichgewicht stellte sich - es handelt sich um zwei 5,5 ml-Kammern, die mit je 3 ml Flüssigkeit gefüllt waren - nach spätestens 16 Stunden bei 37 ° C ein. Es wurden bekannte Mengen CPIB eingesetzt, ein Teil davon C ¹⁴-markiert, und Konzentrationsänderungen so registriert. Der CPIB-Äthylester wurde gaschromatographisch nach Houin (11) gemessen.

4. J.F. Bridgman, S.M. Rosen, J.M. Thorp, 1972 (4):

Vier Kontrollpersonen wurden vier Patienten mit nephrotischem Syndrom gegenübergestellt. Der freie Anteil des CPIB im Plasma war von normal 3,1 - 8,2 % auf 21 - 25 % (ein Fall 3,4 %) erhöht bei gleichzeitiger Erniedrigung des Serumalbumins. Die Gesamtclofibrinsäurekonzentration wurde UV-absorptionsspektrometrisch nach Thorp (22) bestimmt, das freie CPIB durch Ultrazentri-

fugation gewonnen und radioaktiv gemessen (^{14}C -CPIB-Zusatz). Nähere Angaben über die Dauer der Zentrifugation und das praktische Vorgehen liegen nicht vor.

5. J.S. Wain, 1976 (24):

Die Methode entspricht der von Bridgman beschriebenen. Das CPIB ist hier normalerweise zu 98 bis 99 % an Albumin gebunden. Beim nephrotischen Syndrom kann die freie Clofibrinsäure sogar über 40 % der gesamten ausmachen. 2,5 ml des mit ^{14}C -CPIB markierten Plasmas wurden bei 4°C 15 bis 18 Stunden zentrifugiert.

6. J.N. Connor, G.F. Johnson, H.M. Solomon, 1976 (5):

Die Autoren beschreiben eine indirekte rechnerische Bestimmung der freien Clofibrinsäure durch einen Vergleich der CPIB-Konzentration im Plasma und im Speichel. Sie gehen davon aus, daß sich ein Gleichgewicht einstellt zwischen beiden Flüssigkeiten abhängig vom pK der Substanz, den pH-Werten des Speichels und des Serums. Es wurden je ein Fall mit normaler Nierenfunktion und Niereninsuffizienz (Kreatinin-Clearance kleiner als 5 ml/ min) untersucht; es ergaben sich die Werte 96,4 % bzw. 88,8 % Bindung des Clofibrats an das Albumin. Dies entspricht genau den Werten von Gugler u.a. (10). Die CPIB-Bestimmung wurde gaschromatographisch durchgeführt mit den internen Standards p-Chlorophenoxyacetat und 3- (p-Chlorophenoxy-) Propionat. Diese haben den Nachteil, sehr - aber unterschiedlich - flüchtig zu sein.

M e t h o d e n

Gaschromatographie:

Die CPIB-Bestimmung wurde gaschromatographisch nach Gugler und Jensen (1976) durchgeführt (9). Das Verfahren vereint mehrere Vorzüge in sich:

1. Es werden nur 0,5 bis 1 ml Serum (Plasma) benötigt.
2. Als Chemikalien sind außer CPIB für Eichwerte nur Naphtoesäure als interner Standard, HCl zur Proteindenaturierung, Toluol für die CPIB-Extraktion aus dem Plasma und Trimethylanilin-Hydroxid als Methylierungsmittel nötig.
3. Die Clofibrinsäure liegt zuletzt in einer wasserlöslichen Form vor, d.h. die Lösung ist nicht flüchtig, andere Serumbestandteile (freie Fettsäuren, Medikamente) bleiben im organischen Lösungsmittel zurück.
4. Die Methode ist im zu untersuchenden Bereich linear, sie ist ausreichend genau, genügend empfindlich (bis $1 \mu\text{g} / \text{ml}$) und zeitsparend.

Voraussetzung für die gaschromatographische Messung ist die Extraktion der Gesamtclofibrinsäure aus dem Plasma (Serum) bzw. der freien Clofibrinsäure aus dem Dialysat der Gleichgewichtsdialyse. (Abbildung 1)

GLC nach R. Gugler u. Ch. Jensen (1976)

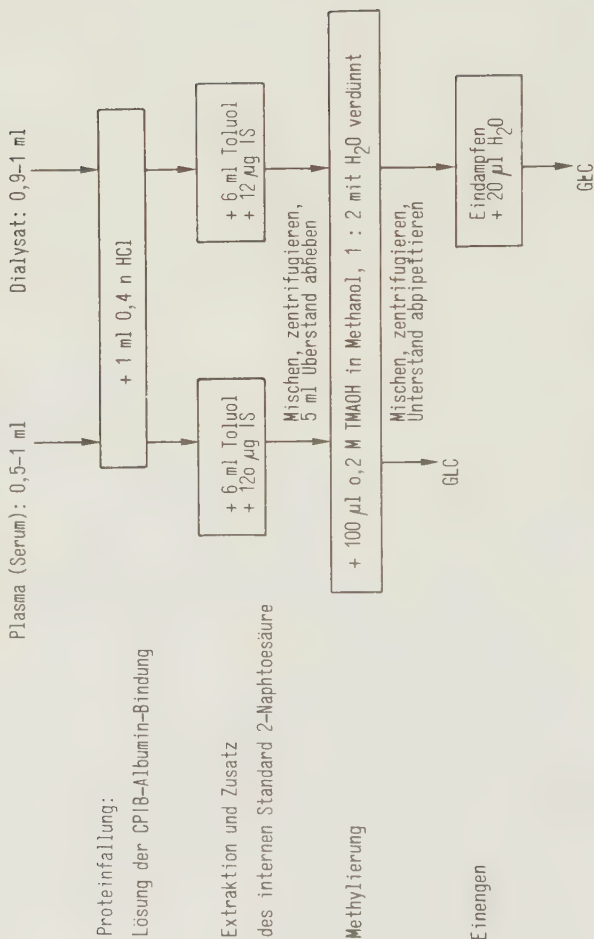


Abb. 1: Schema der Extraktion der Clofibrinsäure aus Plasma (CPIB gesamt) und aus dem Dialysat der Gleichgewichtsdialyse (CPIB ungebunden) zur quantitativen gaschromatographischen Analyse

Von den zu untersuchenden Plasmaproben bzw. den aus der Gleichgewichtsdialyse gewonnenen Pufferlösungen wurden je 1 ml (bei geringerer zur Verfügung stehender Menge entsprechend weniger) in Chromatographiegläser (15 ml, mit Schraubverschluß, Assistent Nr. 970, 112 x 17 mm) gefüllt. Die Plasmaproteine wurden mit 1 ml Salzsäure denaturiert. Dabei löste sich die Bindung des CPIB an das Albumin. Für die Extraktion der Clofibrinsäure aus der wäßrigen Lösung waren je 6 ml Toluol nötig; in ihm wurde auch die Naphtoesäure als interner Standard (IS) hinzugefügt. Von den zwei vorbereiteten Toluol-Lösungen enthielt die eine für die Gesamtbestimmung 20 µg IS /ml (insgesamt 120 µg /6 ml), die andere für die Bestimmung des freien Anteils 2 µg IS / ml (insgesamt 12 µg/ 6 ml).

Es stellten sich schon hier die festen Konzentrationsverhältnisse CPIB zu IS ein, die trotz etwaiger Verluste auf dem Extraktionsweg bis zum Chromatographieren konstant blieben. Dies wird durch die vielen linearen Eichkurven belegt (Abb. 2,3).

Das Zweiphasengemisch wurde 15 Minuten geschüttelt (Rotoshake, Modell Kühner, Fa. B. Braun, Melsungen) bei 80 Umdrehungen pro Minute. Nach einer 5minütigen Zentrifugation (Hettich-Zentrifuge Rotixa, 3000 upm) wurden je 5 ml des Überstandes in neue Chromatographiegläser pipettiert und jeweils 100 µl des 1 : 2 mit Aqua bidest verdünnten Methylierungsmittels Trimethylanilin- Hydroxid

zugemischt. Es folgten wiederum 15minütiges Mischen bei 80 upm und 5minütiges Zentrifugieren bei 3000 upm. Der Unterstand enthielt nun jeweils die wasserlöslichen Methylester der Clofibrinsäure und des internen Standards und konnte für die Gesamtbestimmung direkt in den Gaschromatographen eingespritzt werden; für die Bestimmung des freien Anteils war eine vorherige Eindampfung durch Eindampfen und Lösen in 20 µl Aqua bidest zweckmäßig.

Für beide Bestimmungen wurde jeweils ca. 1 µl in den Chromatographen injiziert.

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit einem VARIAN AEROGRAPH Modell 2700 mit zwei Flammenionisationsdetektoren durchgeführt. Die beiden silanisierten Glassäulen waren 6 Fuß lang und hatten einen Innendurchmesser von 2 mm. Als stationäre Phase diente SE-30, 3%ig, auf dem Trägermaterial Gas-Chrom Q 80-100 mesh. Die Injektortemperatur betrug 290° C, die Säulentemperatur 150° C, die Detektortemperatur 270° C. Die beiden verwendeten Säulen waren unterschiedlich dicht gepackt, die für die Bestimmung der niedrigeren Werte dichter, da so eine bessere Trennung vom Lösungsmittelpeak durch eine Verlängerung der Retentionszeiten erreicht wurde. Die Retentionszeit ist die Zeit, die vom Beginn des Lösungsmittelpeaks bis zum Maximum des zu untersuchenden Peaks verstreicht. Die Trägergasge-

schwindigkeit betrug 23 ml bzw. 40 ml Stickstoff pro Minute. Der Sauerstoff-Fluß belief sich auf 200 ml / min, der Wasserstoff-Fluß auf 20 ml / min. Der Empfindlichkeitsbereich war am Gaschromatographen auf 4×10^{-11} bzw. 4×10^{-12} Ampere pro Millivolt eingestellt, die Schreiber auf eine Spannung von 10 Millivolt. Die im Flammenionisationsdetektor ionisierte Substanz brauchte nur einen Stromfluß im elektrischen Feld des Detektors von 4×10^{-11} bzw. 4×10^{-12} Ampere zu erzeugen, um einen Spannungsabfall von einem Millivolt an einem Widerstand zu erreichen und damit zu einem Zehntel des Vollausschlages des Schreibers zu führen. Die Retentionszeiten betrugen 2,1 und 5,3 min für CPIB und 3,9 und 10,2 min für den internen Standard. Die ersten Werte beschreiben jeweils die Bedingung an der Säule für die Gesamtbestimmung, die zweiten Werte an der Säule für die Bestimmung des freien Plasmaanteils.

Zur Auswertung wurde die Peakhöhen-Methode verwendet und der Quotient der Höhen der Clofibrinsäure zu den Höhen des internen Standarts gebildet. Diese Werte, gegen die eingesetzten Clofibrinsäuremengen aufgetragen, ergaben für den therapeutischen Bereich der Gesamtclofibrinsäure - hier 6 bis 120 μg / ml (Abbildung 2) - einen linearen Verlauf.

Ein entsprechendes Ergebnis zeigt die Eichkurve für die Bestimmung der freien Clofibrinsäure (Abbildung 3). Es sind Werte zwischen 1 und 5 μg dargestellt. Die Punk-

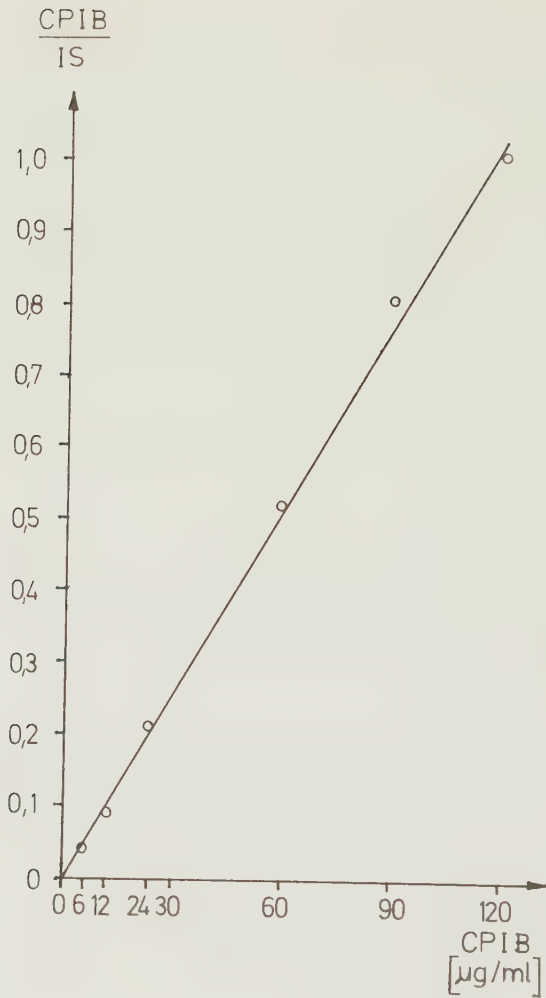


Abb. 2: Eichkurve für die quantitative gaschromatographische CPIB-Bestimmung im therapeutischen Bereich von 6 bis 120 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Serum ($r = 0,9998$)

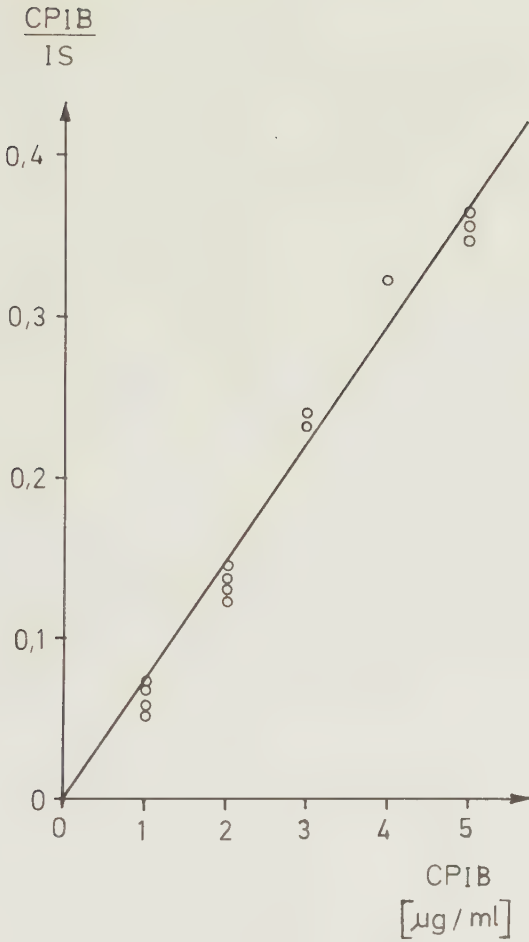


Abb. 3: Eichkurve für die gaschromatographische Bestimmung der freien CPIB-Konzentrationen im Serum von 1 bis 5 µg / ml ($r = 0,993$)

te jeweils gleicher Konzentration sind aus verschiedenen Proben festgestellt.

Die Methode läßt Messungen bis zu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu.

Die jedem Versuchszyklus beigefügten Eichwerte von 20, 70 und 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 3, 7 und 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergaben relative Variationskoeffizienten - das sind die Quotienten aus Standardabweichung und Mittelwert - von 3,3 % für die Gesamtbestimmung und 4,0 % für die Bestimmung der freien Clofibrinsäure (Berechnung aus je zwischen 11 und 13 Werten).

In den Chromatogrammen erschienen außer dem Lösungsmittelpeak, den CPIB- und IS-Peaks keine weiteren Ausschläge, obwohl die Patienten viele andere Medikamente verordnet bekommen hatten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusätzlich zum Clofibrat eingenommene Medikamente, nach Arzneimittelgruppen geordnet

Medikamente zur Behandlung von:	
Ödemen	Amilorid, Chlorthalidon, Furosemid, Hydrochlorothiazid, Spironolacton
Herzinsuffizienz	β -Acetyldigoxin, Digoxin
Koronarinsuffizienz	Glyceryltrinitrat, Isosorbiddinitrat, Nifedipin
Hypertonie	Dihydralazin, Clonidin, α -Methyldopa, Reserpin, Metoprolol, Propanolol
weiteren Herz- und Kreislaufkrankheiten	Dihydroergotamin, Dihydroergotoxin, Orciprenalin, Verapamil
Erkrankungen der Atmungsorgane	Theophyllin
Gerinnungsstörungen	Acenocoumarol, Phenprocoumon, Heparin
Diabetes mellitus	Buformin, Glibenclamid, Glibornurid
Schmerzen und rheu- matischen Erkrankungen	Acetylsalicylsäure, Indometacin, Propyphenazon
Schlafstörungen	Methypylon
Hyperurikämie	Allopurinol, Benzbromaron
psychischen Störungen	Haloperidol, Nomifensin, Bromazepam, Nitrazepam, Oxazepam, Prazepam

1
2
2
1

Gleichgewichtsdialyse:

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die freie von der albumingebundenen Clofibrinsäure zu trennen. Bei allen Methoden besteht - besonders bei längerer Versuchsdauer - die Gefahr, daß sich die Bindungsverhältnisse verändern. Von den selbst geprüften Verfahren lieferte nur das letzte, schließlich angewandte, befriedigende Ergebnisse, da hier die störenden Faktoren am geringsten sind:

Ultrazentrifugation: Das Plasma wurde mit einer Salzlösung zur Ermöglichung der Einstellung eines Dichtegradienten verdünnt und bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ 16 bis 18 Stunden zentrifugiert. Diese unphysiologischen Bedingungen sind von in vivo-Verhältnissen recht verschieden. Eine weitere Schwierigkeit bietet die Entnahme einer möglichst großen Menge der Lösungen aus den Zentrifugenröhrchen ohne Proteinverunreinigung.

Filtration: Das Prinzip besteht darin, die proteinfreie Flüssigkeit des Plasmas mit Zentrifugalkraft oder erhöhtem Gasdruck durch Membranfilter zu pressen. Bei der Zentrifugation ändern sich das Volumen, die Temperatur und der pH-Wert. Borga (3) stellte bei der Zentrifugation eines Visking-Dialyseschlauches mit 10 ml Plasma bei $24 - 26^{\circ} \text{C}$, 800 g für 45 bis 60 Minuten und einer Ausbeute von 600 - 800 μl Ultrafiltrat einen Temperaturanstieg von $2 - 3^{\circ} \text{C}$ und eine pH-Zunahme von 7,6 auf ungefähr 8,1 fest. Die eigenen Versuche mit Centriflo-Ultrafiltrationsmembranen der Amicon GmbH, Witten (Ruhr), ergaben unterschiedliche Proteinmengen im Filtrat, die

sich auch durch Rezentrifugation nicht vermindern ließen (Proteinmessung nach Lowry u.a. -12-), und stark variierende CPIB-Doppelwerte.

Die Filtration mit Hilfe eines erhöhten Gasdruckes beschreibt McQueen (13). 5 ml Plasma werden in einem Visingschlauch bei 37° C einem Druck von 1080 Millibar ausgesetzt. Es entstehen 2 ml Filtrat in der Stunde. Das Filtrat wurde als "gelegentlich trübe" geschildert. Spector (21) beschreibt die Abhängigkeit der Bindung vom Gasdruck bis in eine Höhe von über 3000 Millibar. Die Proteinbindung von Strophantin und Digoxin nahm proportional zum Druck zu. Wir selbst haben mit diesen Apparaturen der Firmen Amicon, Witten (Ruhr), und Millipore, Neu-Isenburg, (wie von Spector beschrieben), die Erfahrung gemacht, daß die Filtration entsprechender Mengen (ca. 1 ml) mit den nötigen Membranen niedriger Proteinausschlußgrenze (Molekulargewicht 1000) mehrere Stunden benötigt.

Um die Trennungszeit kurz zu halten, wurden auch Sephadex G 10- und G 15-gefüllte kleine Säulen (Durchmesser 7 mm, 3 cm und 6 cm hoch) erprobt. Cooper und Wood (6) fordern zur Vermeidung der Dissoziation des Protein-Ligandenkomplexes die Verwendung relativ geringer Mengen Elutionsflüssigkeit und eine kurze Elutionszeit. Obwohl diese Bedingungen erfüllt waren und die Proteine als scharfer Peak ausgewaschen wurden (Proteinbestimmung nach Lowry -12-), ließen sich die Ergebnisse nicht

reproduzieren. Dies gilt sowohl für die Konzentration des gewonnenen ^{14}C -markierten freien CPIB als auch für die Menge an Spülflüssigkeit bei Mehrfachbestimmungen, die zum Auswaschen des CPIB-Peaks nötig war.

Gleichgewichtsdialyse:

Den physiologischen Gegebenheiten kommt die Gleichgewichtsdialyse am nächsten. Dazu trägt besonders die Ausführung des Geräts Dianorm (Bezug durch die Firma Bachofer, Reutlingen) bei.

Es umfaßt 20 Zellen. Jede Zelle besteht aus zwei unempfindlichen Teflonscheiben, die die Kammern bilden. Die dazwischen liegende Membran wird beim Aufeinanderlegen der Scheiben durch den gegengleichen Rand angespannt, die Zelle abgedichtet. Das Füllen und Entleeren der Zellen erfolgt durch Bohrungen, die durch Stopfen verschlossen werden. Je 5 Zellen bilden eine Einheit; sie werden durch federnde Zwischenstücke in einem Zellenträger zusammengehalten. Ein Antriebsaggregat, das ins Wasserbad gestellt werden kann und in dem die vier Zellenträgereinheiten befestigt werden, sorgt für eine variierbare, für alle Versuche gleich zu wählende Rotationsbewegung um die Längsachse der Träger. Diese Konstruktion ermöglicht das Arbeiten mit kleinen, exakten Volumina - im Gegensatz zur Dialyse mit verknoteten Visingschläuchen - bei konstanter Temperatur im Wasserbad, die durch die große Zellenoberfläche gut übertragen wird. Die flachen Kammern sind durch eine relativ

große Membranfläche getrennt, die Flüssigkeiten werden dauernd schonend bewegt. Dies führt zu einer Verkürzung der Dialysezeit.

Für unsere Versuchszwecke wurden Zellen mit zweimal einem Milliliter Arbeitsvolumen gewählt. Das maximale Volumen der Kammer betrug 1,15 ml, das minimale Volumen 0,6 ml. Es wurden Dialysemembranen der Fa. Diachema verwendet mit einem Durchmesser von 63 mm und einer Trennfläche in der Zelle von 11,3 cm². Die Membranen hatten eine Molekularausschlußgrenze von 5000. Vor Gebrauch mußten sie mindestens 5 Minuten in Aqua bidest. und zweimal 5 Minuten in der verwendeten Pufferlösung eingeweicht und äquilibriert werden. Um den Plasma-pH-Wert zu erhalten, wurde dem Plasma in der zweiten Kammer ein 150 mM Natriumphosphatpuffer des pH-Wertes 7,4 gegenübergestellt. Die Messung der Gefrierpunktserniedrigung stellte die Plasmaisotonicität fest.

Ergebnisse der in vitro-Vorversuche zur Gleichgewichtsdialyse

Membranbindung:

Vorversuche konnten eine Bindung der Clofibrinsäure an die Membran ausschließen. Dies wurde folgendermaßen überprüft: 9,8 ml frisches Plasma wurden mit 1,5 mg Clofibrinsäure in 0,2 ml wäßriger Lösung über 28 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Jeweils 5 Plasmaproben zu einem Milliliter mit 150 µg Clofibrinsäure wurden dann 2 Stunden gegen die gleiche Menge des Phosphatpuffers dialysiert. Die danach im Puffer und im Plasma gemessenen Clofibrinsäuremengen ergaben addiert im Mittel 148,4 µg. Dies entspricht im Rahmen der Fehlerbreite der quantitativen Messung den eingesetzten 150 µg. Weitere Untersuchungen bei niedrigeren Clofibrinsäurekonzentrationen auf konzentrationsabhängige Membranbindung wurden dadurch überflüssig.

Einstellung des Gleichgewichts in Abhängigkeit von der Zeit:

Mit einer entsprechenden Versuchsanordnung wurde festgestellt, daß sich bei 37° C und 16 Umdrehungen pro Minute nach spätestens 2 Stunden auch für Clofibrinsäurekonzentrationen im oberen Therapiebereich das Gleichgewicht eingestellt hatte. Es wurden zuerst gleiche Proben mit je 150 µg CPIB / ml Plasma 1,2,3,4 und 5 Stunden gegen je 1 ml Phosphatpuffer dialysiert und die CPIB-Mengen danach im Puffer bestimmt mit maximalen Werten nach der 2. Stunde und dann, um zu prüfen, ob

die Dialysenzeit verkürzt werden könnte, wieder 5 Proben 15,30,45,60 und 75 Minuten mit der höchsten Konzentration nach 75 Minuten. Die günstigste Dialysezeit - das ist die kürzeste Zeit, nach der sich sicher ein Gleichgewicht eingestellt hatte - wurde also auf 2 Stunden festgesetzt.

Beziehung der freien Clofibrinsäuremenge zum eingesetzten Puffervolumen:

Ein weiterer Versuch ergab, daß die freie CPIB-Konzentration im Puffer unabhängig vom anfangs eingefüllten Puffervolumen war: 6,86 ml Plasma wurden 21 Stunden im Kühlschrank mit 1050 μ g Clofibrinsäure in 140 μ l H₂O inkubiert. Je 1 ml Plasma wurde in 5 Zellen gegen 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 und 1,1 ml Phosphatpuffer dialysiert und die freien Clofibrinsäuremengen im Puffer gemessen.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt: Die festgestellte Clofibrinsäuremenge ist proportional zum Puffervolumen, die Konzentration im Puffer, die im Gleichgewicht mit der im Plasma steht, konstant. Die gemessene Clofibrinsäuremenge konnte bei geringen Abweichungen des gewonnenen Puffervolumens, das jeweils genau bestimmt wurde - es blieb ja immer etwas Flüssigkeit an der Wand der Kammer zurück - rechnerisch auf die Konzentration in 1 ml korrigiert werden.

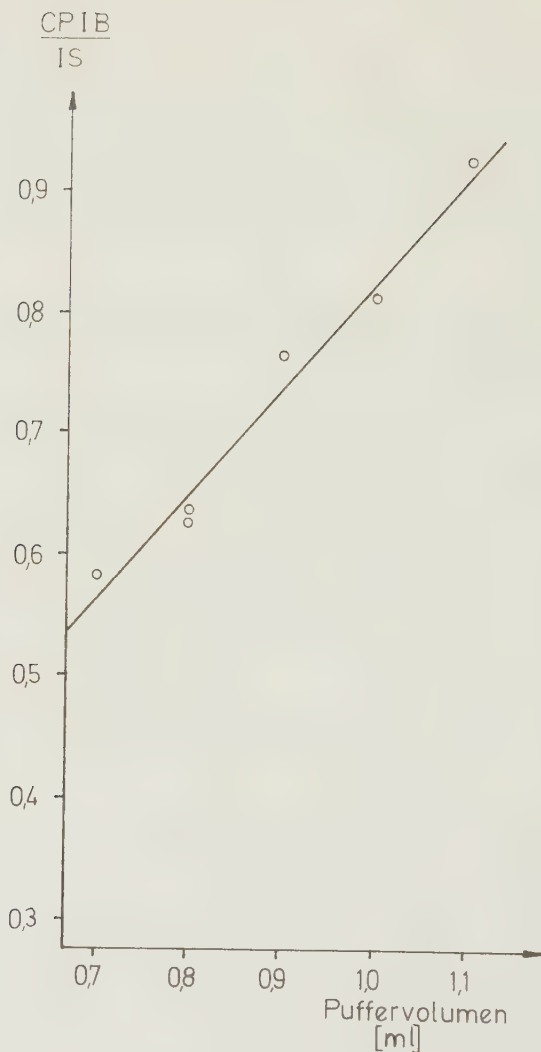


Abb. 4 zeigt eine lineare Abhängigkeit der gemessenen Clofibrin-säuremengen (dargestellt durch das Verhältnis der Peak-Höhen CPIB zu Interner Standard) vom eingesetzten Puffervolumen. In der Dialysekammer stellt sich im Gleichgewicht unabhängig vom Puffervolumen eine konstante Konzentration der ungebundenen Clofibrinsäure ein.

Konzentrationsabhängigkeit der Clofibrinsäure - Albuminbindung:

Als nächstes wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Albuminbindung überprüft. 5 Proben des gleichen Plasmas wurden mit verschiedenen Clofibrinsäuremengen 21 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Die Proben enthielten 50, 100, 150, 200 und 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Serum. Sie wurden wiederum gegen 1 ml Phosphatpuffer 2 Stunden lang dialysiert. Die freie Clofibrinsäure wurde danach bestimmt. Es zeigte sich, daß ihre Konzentration bei Zunahme der Ausgangsplasmakonzentration überproportional anstieg (Abb. 5). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Beaumont und Dachet von 1976 (2) überein, die mit Humanserum-Albumin-Lösungen gewonnen wurden.

Bei der Berechnung des ungebundenen CPIB-Anteils blieb der Raumbedarf der Proteine und anderen Serumbestandteile unberücksichtigt. Nach der Formel von Peters (15) beträgt der Wassergehalt des Serums in $\text{g} / 100 \text{ ml} = 98,40 - (0,718 \times \text{Proteingehalt in } \text{g} / 100 \text{ ml Serum})$. Die Zahl 98,40 statt der vollen 100 berücksichtigt den Raumbedarf für Mineralien und andere Serumbestandteile. Die untersuchten Plasmen hatten Proteingehalte zwischen 6,1 und 8,5 $\text{g} / 100 \text{ ml}$. Dies ergibt einen Volumengehalt von 6,0 bis 7,7 %. Es handelt sich also um einen relativ konstanten systematischen Fehler, der im Einzelfall bei Kenntnis der Plasmaproteinkonzentration rechnerisch beseitigt werden kann.

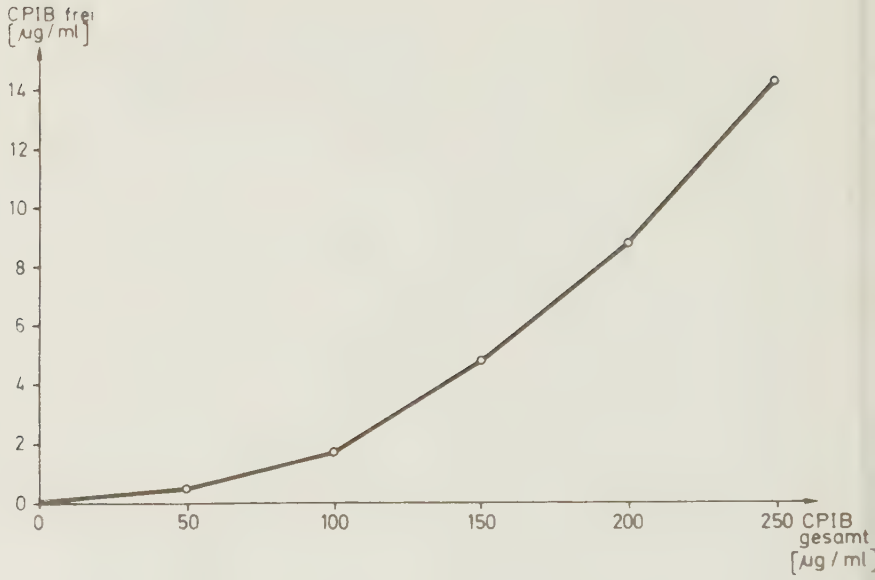


Abb. 5 zeigt den überproportionalen Anstieg der freien Clofibrinsäure bei Zunahme der Gesamtkonzentration.

E r g e b n i s s e

Zunächst untersuchten wir das Verhalten der Clofibrinsäure-Plasma-Konzentration unter den Bedingungen, wie sie bei einer Behandlung angewandt werden. Sechs stationäre Patienten mit Hyperlipoproteinämie und normaler Nierenfunktion (Serumkreatinin $\leq 1,2$ mg / 100 ml) im Alter von 40 bis 66 Jahren, drei männliche und drei weibliche, erhielten alle 12 Stunden 1 g Clofibrat und zwar um 8 Uhr und um 20 Uhr. Die Blutentnahmen erfolgten vor Therapiebeginn für jeweils einen Leerwert und täglich vor der Morgendosis, also 12 Stunden nach der letzten Einnahme. Es wurden die Gesamtclofibrinsäurekonzentration und der freie Anteil in 1 ml Plasma bestimmt (Abb. 6). Die Abbildung stellt den Anstieg beider Größen im Verlauf der ersten Tage dar. Nach 3 bis 4 Tagen stellten sich steady-state-Spiegel sowohl für die gesamte als auch für die freie Clofibrinsäure ein mit Werten zwischen 104 und 158 μg / ml bzw. 1,6 und 4,5 μg / ml - dies entspricht 1,6 bis 3,3 %. Mit Zunahme der Gesamtkonzentration stieg zusätzlich der prozentuale ungebundene Anteil an. Die zwei jeweils zusammengehörigen Kurven zeigten bei allen Patienten gleichsinnige Verläufe bei Konzentrationsschwankungen, das heißt: Beide Kurven stiegen in der Regel miteinander an und fielen miteinander ab.

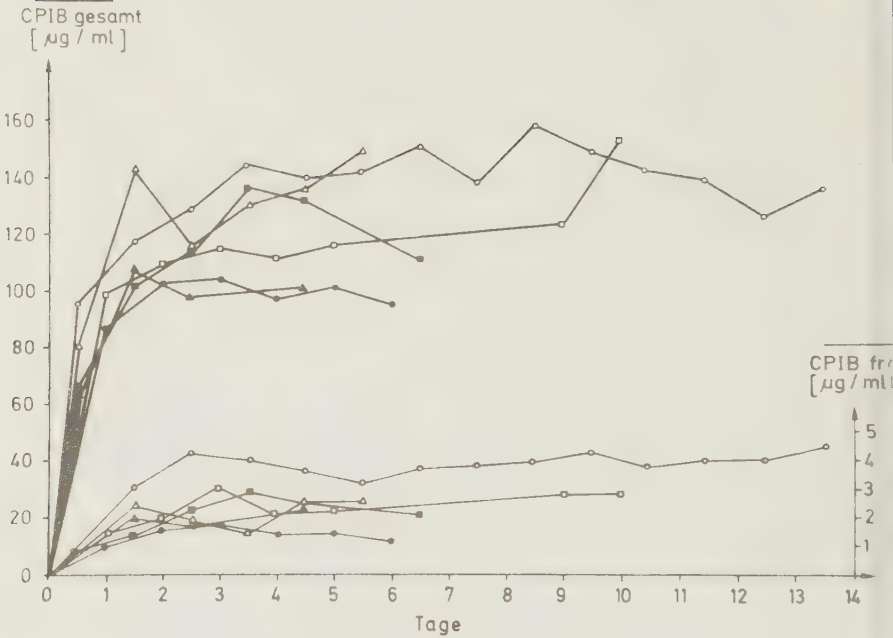


Abb. 6 zeigt den Beginn der Clofibrattherapie bei 6 Patienten mit Hyperlipoproteinämie bis zum Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen (Dosis: 2 g / d). Es sind die jeweiligen Konzentrationen der gesamten (oben) und der freien (unten) Clofibrinsäure der einzelnen Patienten dargestellt.

Um das Verhalten der Clofibrinsäurespiegel bei Veränderungen verschiedener Serumparameter zu beobachten, untersuchten wir in 91 Blutproben von 48 ambulanten Patienten gleichzeitig die gesamte und die ungebundene Clofibrinsäurekonzentration und die Beziehung zu den am gleichen Tag vom Klinisch-Chemischen Institut bestimmten Werten anderer Serumbestandteile.

Es handelte sich bei den Patienten um 15 Frauen und 33 Männer mit Fettstoffwechselstörungen, in der Mehrzahl (32 Personen) mit Hyperlipoproteinämien des Typs IV nach Fredrickson. Die Maße und Gewichte der zwischen 35 und 77 Jahre alten Patienten sind - nach Frauen und Männern aufgeteilt - in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Durchschnittliche Maße und Gewichte der untersuchten Patienten

	Anzahl	Lebensalter in Jahren	Größe in cm	Gewicht in kg	Übergewicht in %
Männer	33	57,3	171,5	78,9	10,4
Frauen	15	64,4	160	64,8	8,7

Außer den Fettstoffwechselstörungen lagen noch weitere Erkrankungen vor, die mit den schon erwähnten Medikamenten behandelt wurden: 13 Patienten litten an Hypertonie, 9 an koronarer Herzkrankheit, 8 an Herzinsuffizienz; bei 4 Patienten wurde ein latenter, bei 12 ein

manifestester Diabetes mellitus festgestellt. Die Harnsäure im Blut war in 10 Fällen erhöht. Weitere Erkrankungen, die mehrmals auftraten, waren: Leberparenchymschäden bezw. Leberzellverfettung 6 mal, Zustand nach Pankreatitis 3 mal, Antikörpermangelsyndrom 3 mal und schließlich chronische Glomerulonephritis mit nephrotischem Syndrom 3 mal. Bei 5 Patienten wurde Protein im Urin nachgewiesen, Gesamteiweiß und Serumalbumin lagen jedoch immer im Normbereich.

Das Clofibrat wurde bis zur Blutentnahme mindestens 4 Wochen, im Durchschnitt ungefähr 9 Monate eingenommen. Die verordnete Dosierung war in einem Fall unbekannt, betrug bei 2 Patientenseren 0,5 g / die, bei 13 Patientenseren 1,0 g / die, bei 37 Patientenseren 1,5 g / die und bei 38 Patientenseren 2,0 g / die.

Die Messungen ergaben die in Tabelle 3 dargestellten Werte für die gesamte und die freie Clofibrinsäure im Serum.

Tabelle 3: Konzentrationen der freien und der gesamten Clofibrinsäure, gemessen in 91 Serumproben

	Spannweite	Mittelwert	Standard- abweichung
CPIB - gesamt in μg / ml	23,9 - 149,2	85,9	29,4
CPIB - ungebunden in μg / ml	0,23 - 8,99	1,79	1,31
CPIB - ungebunden in % des CPIB-ges.	0,48 - 8,87	2,0	1,1

Die Aufteilung der CPIB-Gesamtspiegel nach den verordneten Dosierungen ergab keine großen Unterschiede (Tabelle 4; siehe auch Abbildung 7).

Tabelle 4: Aufteilung der CPIB-Gesamtspiegel in μg / ml Serum nach den verordneten Tagesdosen

	Spannweite	Mittelwert	Standardabweichung
1,0 g	49,4 - 130,5	83,0	28,1
1,5 g	23,9 - 139,9	82,0	26,2
2,0 g	37,3 - 149,2	93,5	32,0

Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Zeitraum zwischen der letzten Einnahme und der Blutabnahme von Patient zu Patient unterschiedlich war und daß einige Patienten offensichtlich eigenmächtig ihre Dosis herabgesetzt hatten.

Der Vergleich der Gesamtclofibrinsäurekonzentrationen mit den dazugehörigen Konzentrationen des ungebundenen Anteils ergibt eine statistisch signifikante Korrelation ($p = 0,01$) zwischen beiden Größen bei einem Koeffizienten von 0,656. Dasselbe gilt für die einzelnen Dosierungen (1 g / die: $r = 0,791$; 1,5 g / die: $r = 0,755$; 2 g / die: $r = 0,783$).

Der Winkel zwischen den Regressionsgeraden in Abbildung 7, ein Maßstab für die Signifikanz der Beziehung, beträgt 21 Grad. Die Abbildung zeigt außerdem eine Verteilung der Dosierungen fast unabhängig von den Konzentrationen. Die Anordnung der Punkte läßt sogar einen überproportionalen Anstieg der freien Clofibrinsäurekonzentration bei Zunahme der Gesamtkonzentration vermuten, wie ihn schon der in vitro-Vorversuch für einen größeren Bereich (50 bis 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$) gezeigt hat. Für den therapeutischen Bereich, der vor allem Werte zwischen 45 und 125 μg CPIB / ml umfaßt, kann man nach dem Diagramm von einer linearen Beziehung ausgehen.

Wegen der bei Niereninsuffizienz und Hypalbuminämie beschriebenen Nebenwirkungen untersuchten wir zunächst die Beziehung zwischen gesamter und freier Clofibrinsäure und der Albuminkonzentration im Serum.

Dabei ergab sich keine Korrelation zwischen der Gesamtclofibrinsäure und dem Albumin in 90 Seren (Abb. 8). Die Albuminwerte reichten von 3,66 bis 5,8 g / 100 ml

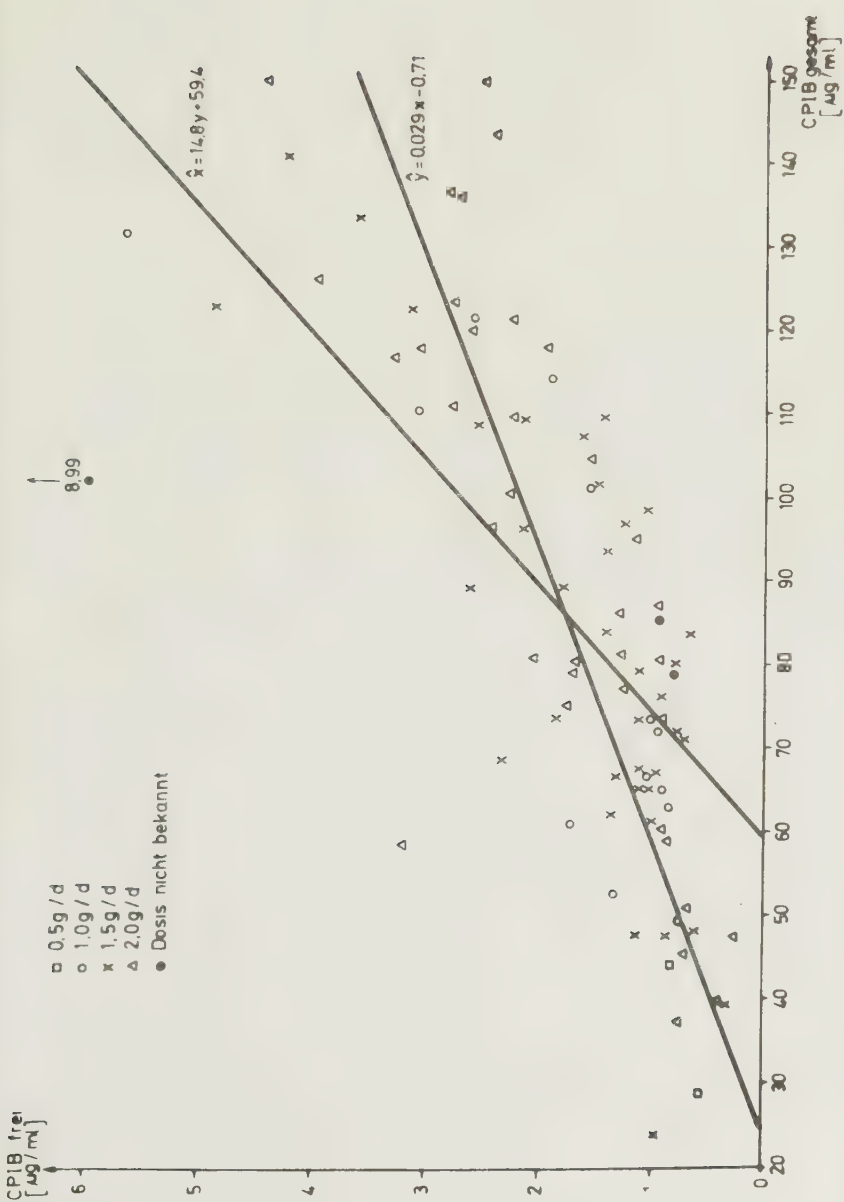


Abb. 7 zeigt die signifikante Korrelation zwischen freier und Gesamt-Clofibrinsäure bei 91 Seren. Die verordnete Dosierung von 0,5 g bis 2,0 g Cloflbrat / d ist gekennzeichnet.

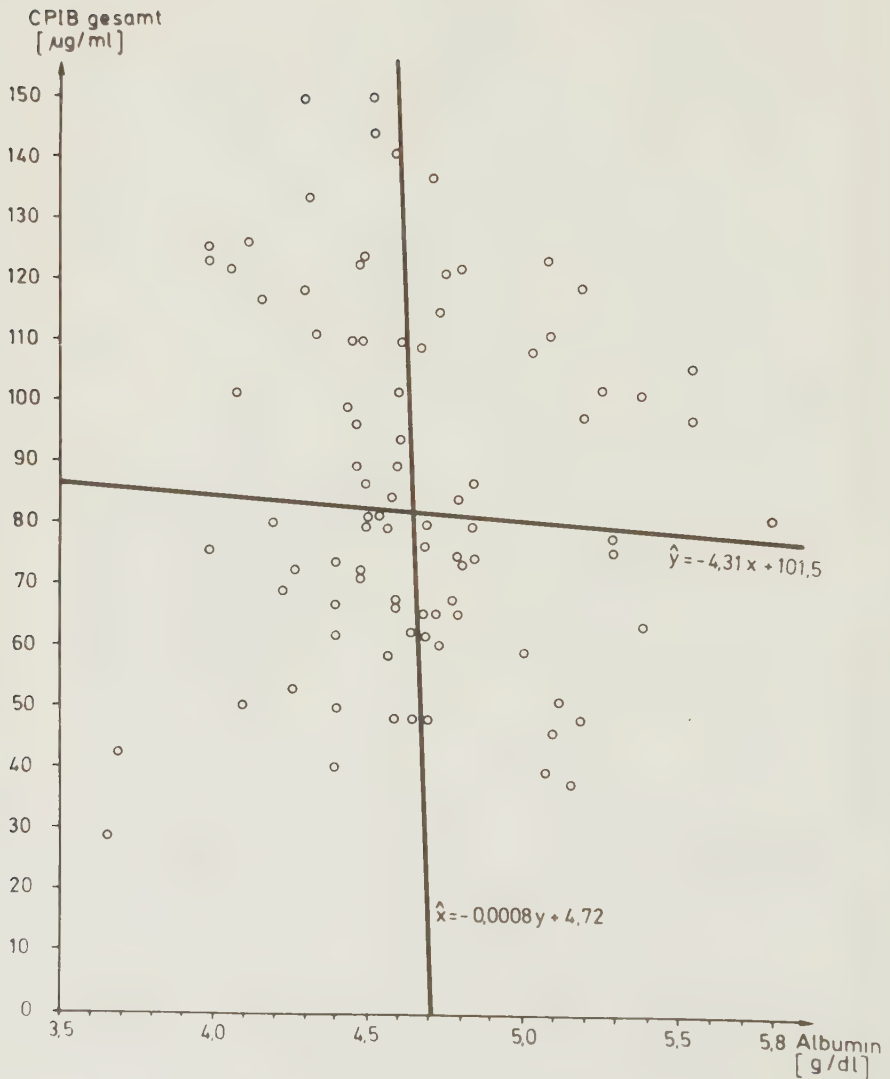


Abb. 8 zeigt die Gesamtclofibrinsäure gegen das Serumalbumin von insgesamt 90 Proben aufgetragen. Es besteht keine signifikante Korrelation.

Serum. Die Regressionsgeraden schließen den großen Winkel von 83 Grad ein. Auch die Aufgliederung der Albuminkonzentrationen in 3 Untergruppen bis 4 g, über 4 g bis 5 g und über 5 g / 100 ml Serum und nach den Dosierungen ergab keine signifikante Beziehung.

Im Gegensatz dazu fanden wir eine signifikante negative Korrelation ($r = -0,499$, $p = 0,01$) zwischen dem Serumalbumin und der freien Clofibrinsäure. Es wurden 33 Proben von 18 Patienten mit einer Medikation von 2 g Clofibrat pro Tag untersucht. Die Konzentrationen an freier Clofibrinsäure nahmen mit steigenden Albuminspiegeln ab (Abb. 9). Der Winkel zwischen den Regressionsgeraden beträgt hier 35 Grad. Für die anderen Dosierungen und alle Proben insgesamt war die Beziehung nicht statistisch signifikant.

Wir untersuchten weiterhin den Zusammenhang zwischen den Clofibrinsäure- und den Serumkreatininwerten. Auch hier kamen wir zu den gleichen Ergebnissen.

In Abbildung 10 sind die Gesamtclofibrinsäurekonzentrationen in Abhängigkeit von den Serumkreatininwerten dargestellt. Die Kreatininspiegel reichten von 0,6 bis 13,4 mg%. Bei diesen 97 Proben ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der Kreatininkonzentration und der Gesamtkonzentration an Clofibrinsäure ($r = 0,0509$). Der Winkel zwischen den Regressionsgeraden von 77 Grad macht dies deutlich. Dies trifft auch für die einzel-

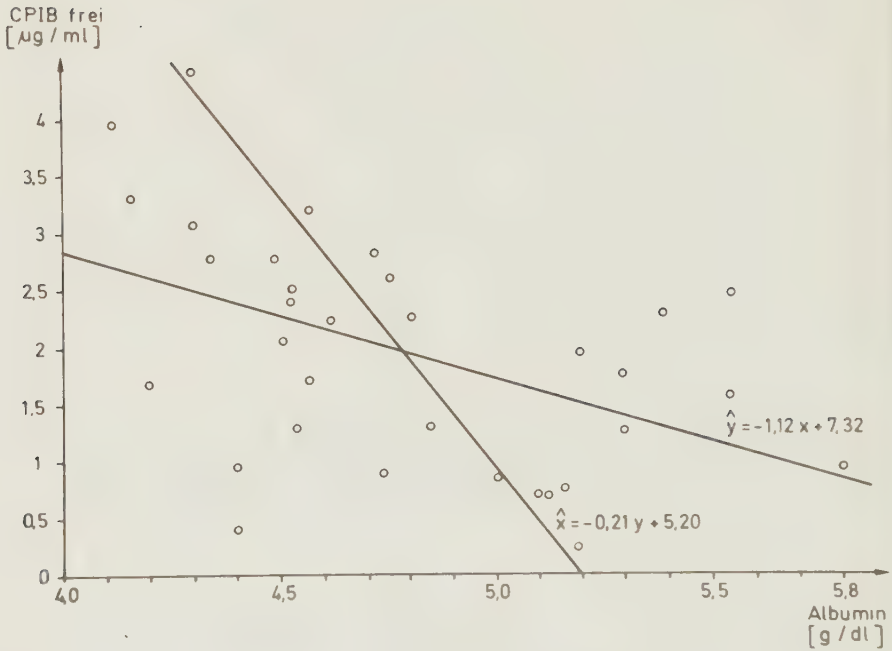


Abb. 9 zeigt die signifikante negative Korrelation zwischen dem Serumalbumin und der freien Clofibrinsäure (in $\mu\text{g} / \text{ml}$) aus 33 Proben.

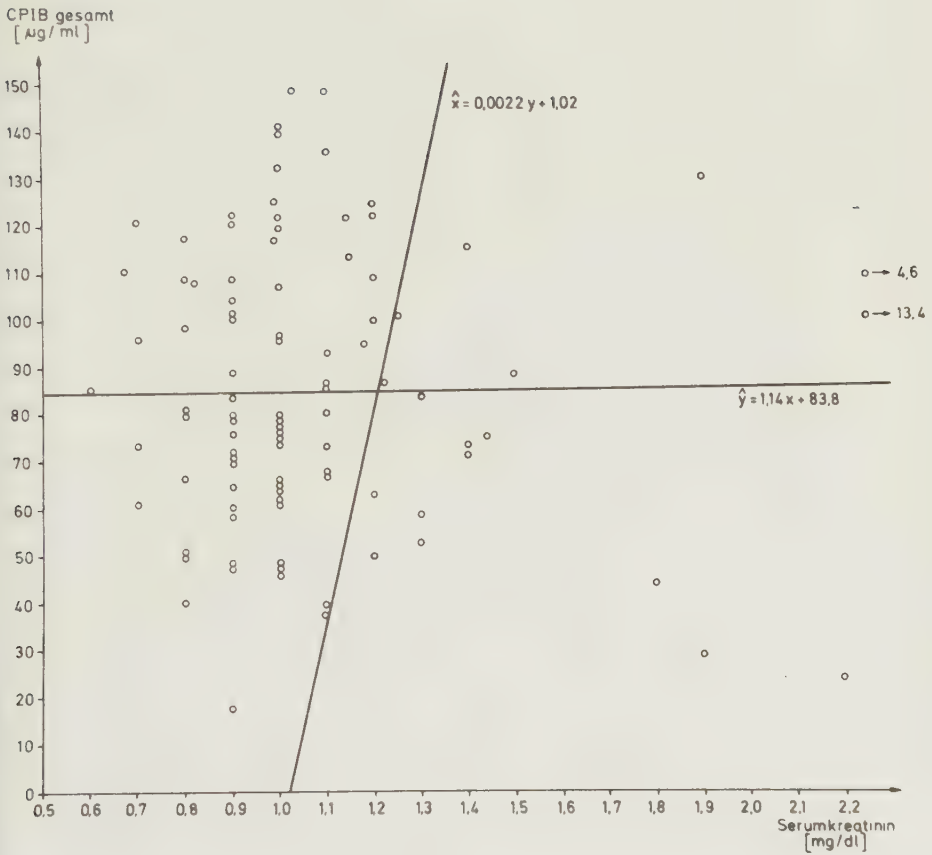


Abb. 10 zeigt die Gesamtclofibrinsäurekonzentrationen in Abhängigkeit von den Serumkreatininwerten dargestellt (97 Proben). Es besteht keine signifikante Beziehung.

nen Dosierungsgruppen zu.

Dafür stellte sich eine positiv signifikante Beziehung zwischen den freien Clofibrinsäureanteilen - absolut und relativ - und den Kreatininwerten ($r = 0,591$ bzw. $r = 0,685$) heraus. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt jeweils 1 Prozent (Abb. 11 und 12). Die Regressionsgeraden schließen Winkel von 12 Grad bzw. 7,5 Grad ein. Diese Untersuchung umfaßte 89 Proben. Das Ansteigen der Serumkreatininkonzentration führte also zu einer Erhöhung des nicht gebundenen Clofibrinsäureanteils. Dieses Verhalten ist für die einzelnen Dosisuntergruppierungen auf Grund der jeweils geringeren Probenanzahl statistisch nicht nachweisbar.

Eine Zerteilung der prozentualen ungebundenen CPlB-Konzentrationen nach den dazugehörenden Kreatininwerten zeigte eine Differenz der Mittelwerte. Die Gruppe mit den Kreatininkonzentrationen $\leq 1,2 \text{ mg\%}$ ergab bei 74 Plasmaproben einen Mittelwert von $1,88 \%$ ($s_x = 0,78$), die andere Gruppe mit den Kreatininspiegeln $> 1,2 \text{ mg\%}$ hatte einen Mittelwert von $2,63 \%$ ($s_x = 1,98$). Sie umfaßte aus den anfangs genannten Gründen nur 15 Proben. Die Werte dieser beiden unabhängigen "Stichproben der Grundgesamtheit" wurden nun dem U-Test bei Rangaufteilung nach Wilcoxon, Mann und Whitney (18) unterworfen, um die Signifikanz des Unterschieds der Mittelwerte zu überprüfen. Dieser Test, der nicht die Normalverteilung voraussetzt, konnte die Differenz nicht mit der

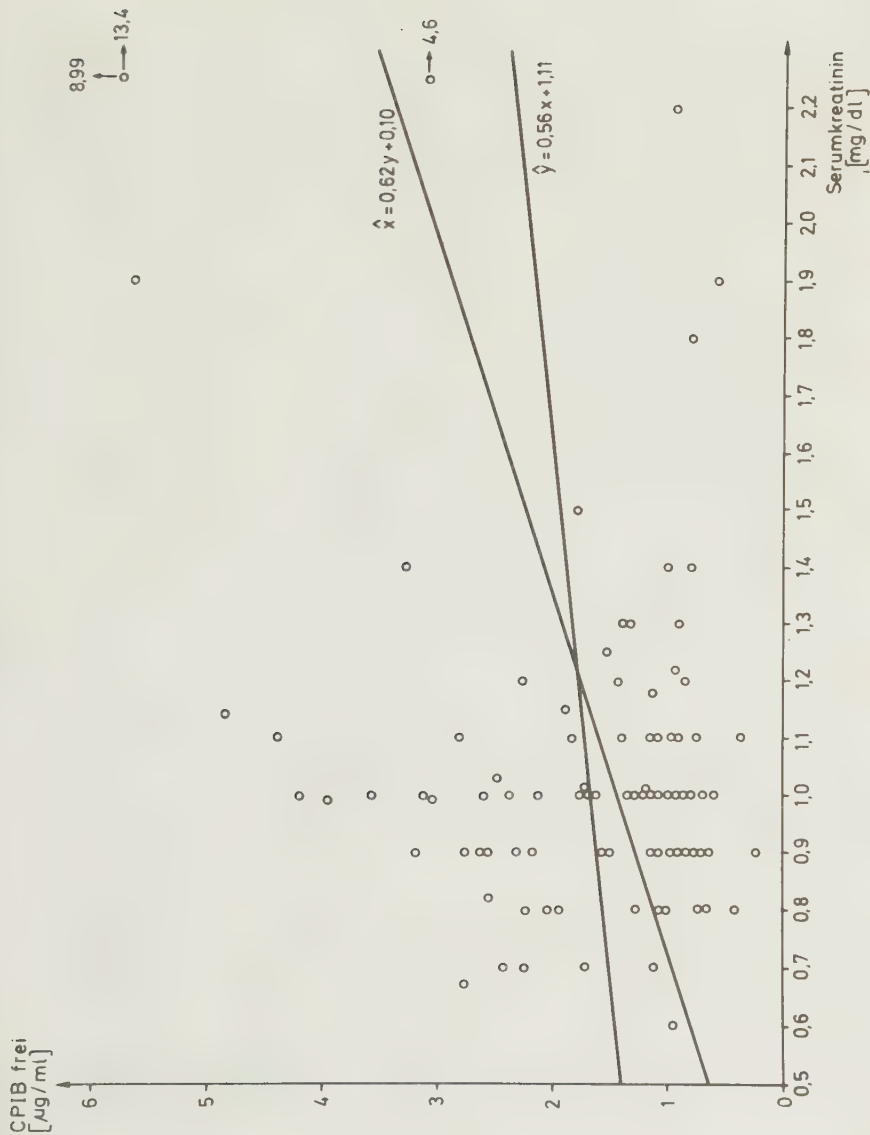


Abb. 11 zeigt die signifikante positive Korrelation zwischen dem Serumkreatinin und der freien Clofibrinsäure (in $\mu\text{g/ml}$) aus 89 Proben.

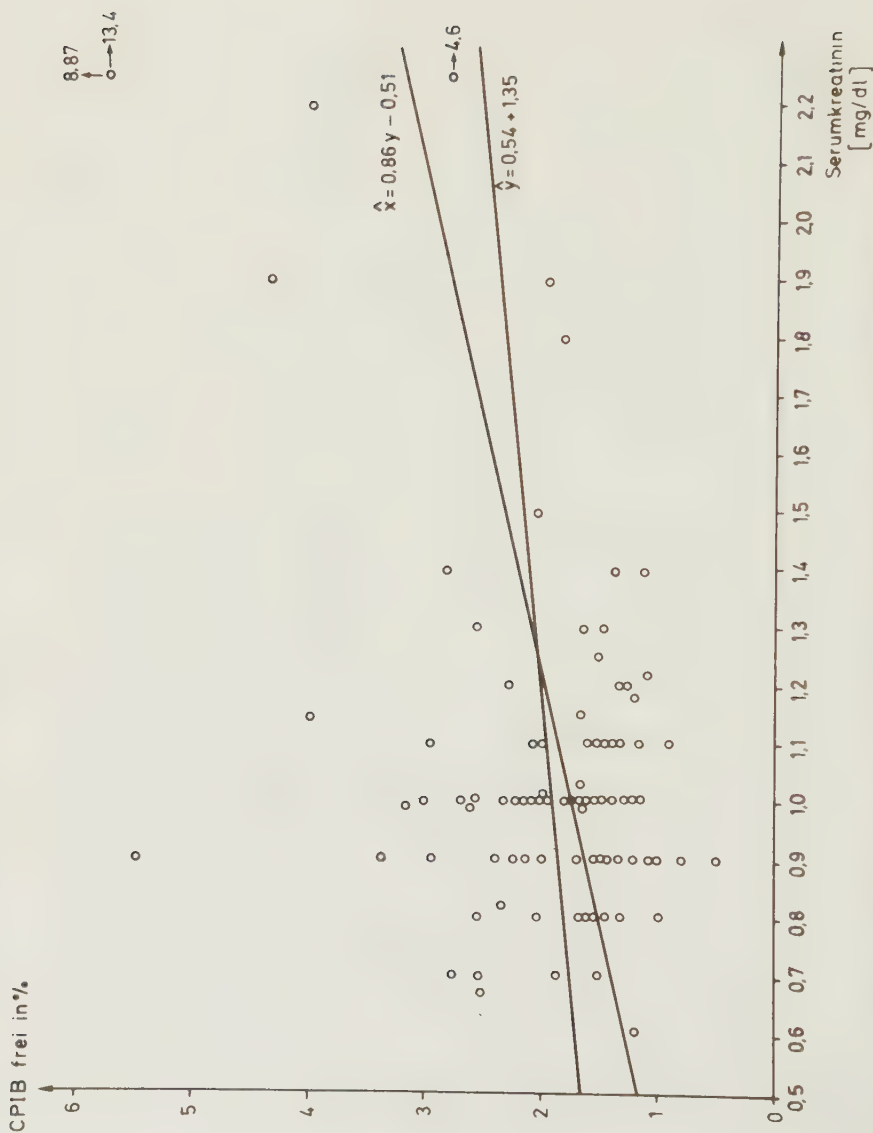


Abb. 12 zeigt die signifikante positive Korrelation zwischen dem Serumkreatinin und dem freien Clofibrinsäureanteil (in % der Gesamtkonzentration).

nötigen Wahrscheinlichkeit statistisch belegen.

Die nächste Frage war, ob ein Zusammenhang zwischen den gesamten und freien Clofibrinsäurekonzentrationen und den Plasmalipiden, die dieses Medikament langfristig senken soll, auch beim Vergleich von Einzelserumproben verschiedener Patienten nachgewiesen werden kann.

Es hat sich gezeigt, daß bei 79 Proben eine statistisch auffällige negative Korrelation ($r = -0,2621$, $p = 0,05$) zwischen den Gesamtwerten der Clofibrinsäure und den Triglyzeridwerten im Plasma (Spannweite von 84 bis 2814 mg / 100 ml) bestand (Abb. 13). Für 36 Proben war die Aufteilung der Triglyzeride auf die Lipoproteine VLDL, LDL und HDL mit Hilfe der Ultrazentrifuge bekannt. In der VLDL-Fraktion, die den größten Teil der Triglyzeride (hier Werte zwischen 37 und 938 mg / 100 ml) beinhaltet, bestand ebenfalls eine statistisch auffällige negative Korrelation ($r = -0,389$, $p = 0,05$), (Abb. 14). Die Winkel zwischen den Regressionsgeraden betragen 59 Grad für das Gesamtserum und 47 Grad für die VLDL-Fraktion.

Die Zusammenstellung der Wertepaare der freien Clofibrinsäure, absolut und in Prozenten, und der Triglyzeride ließ weder für die Plasmawerte noch für die Lipoproteinfraktionen statistisch verifizierbare Aussagen über eine Verknüpfung dieser Größen untereinander zu.

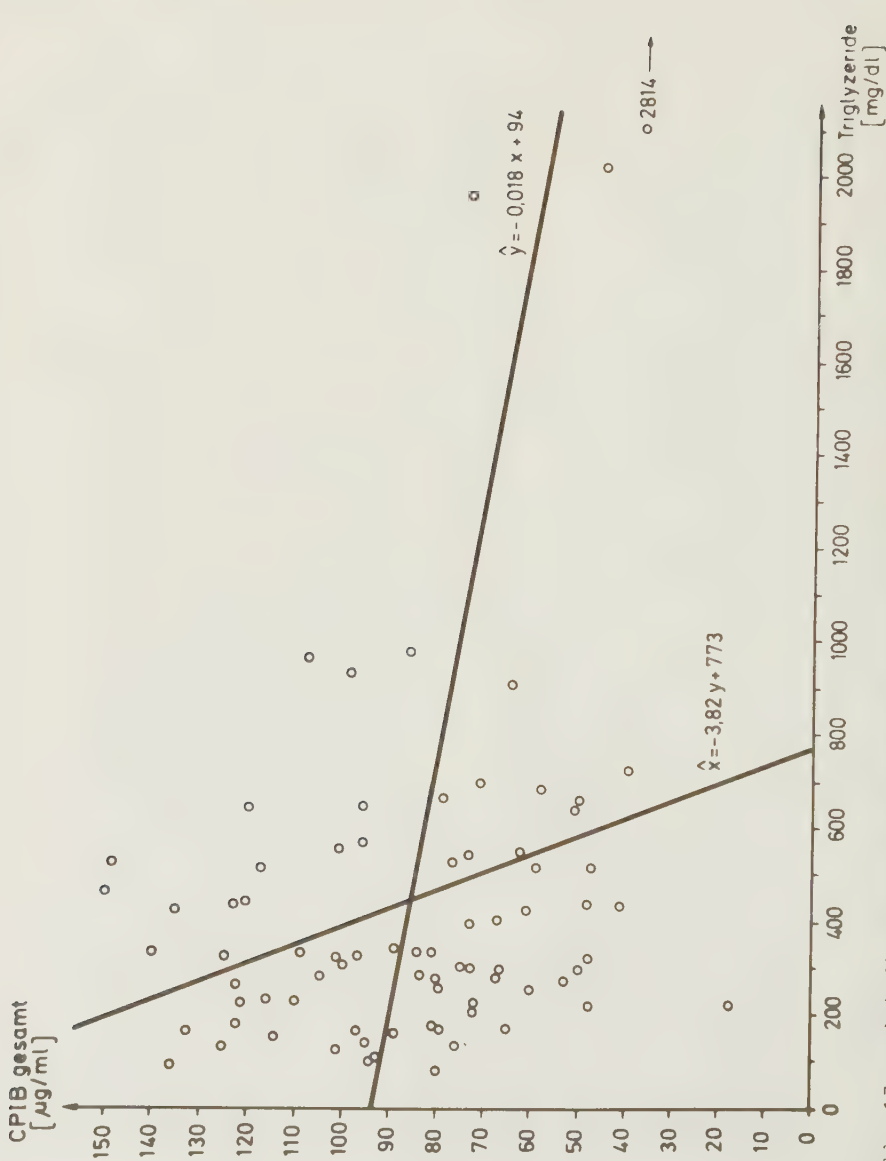
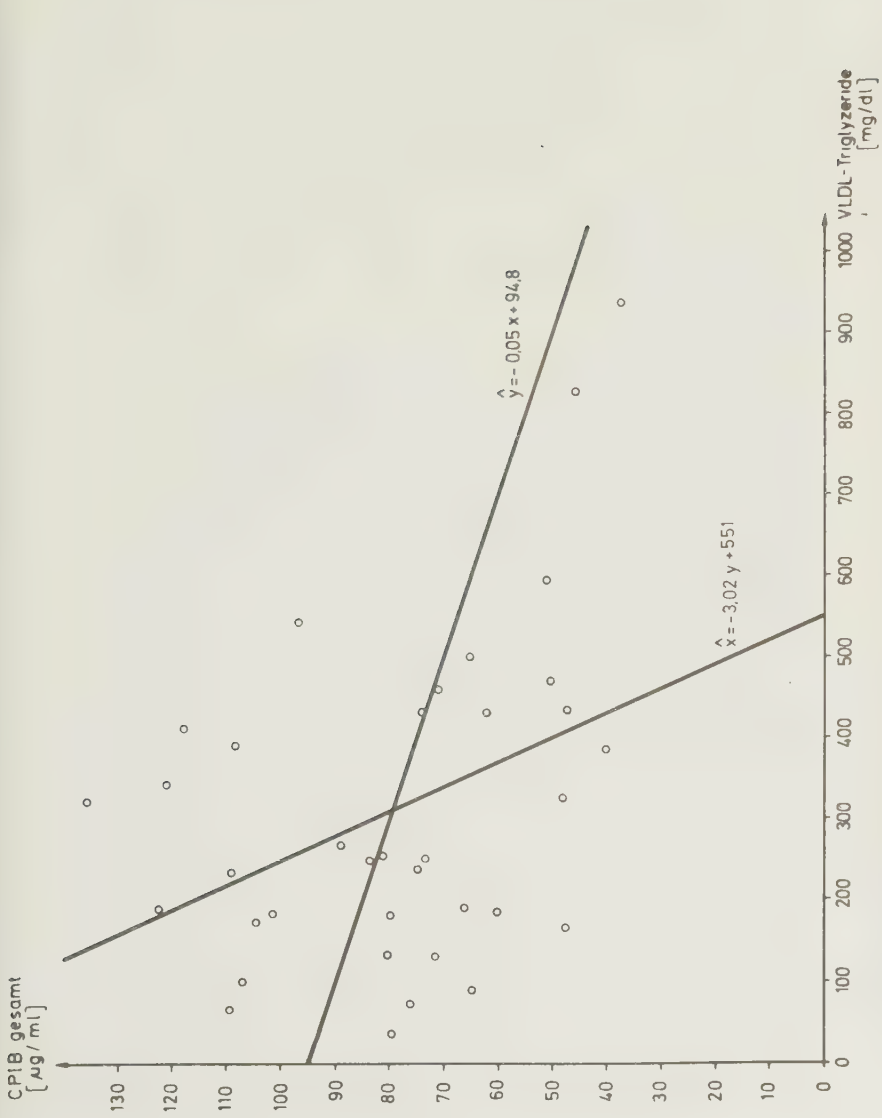


Abb. 13 zeigt die statistisch auffällige negative Beziehung zwischen den Clofibrinsäuregesamt- und den Triglyzeridkonzentrationen in 79 Serumproben.



Dies bedeutet, daß nur für höhere CPIB-Gesamtkonzentrationen, nicht aber für höhere Spiegel der freien Säure, erniedrigte Triglyzeridwerte nachgewiesen werden können. Eine getrennte Untersuchung der Seren mit höheren Triglyzeridwerten (über 600 mg% TG im Gesamtserum, über 300 mg% in den VLDL) erbrachte wegen der geringen Anzahl der Proben pro Gruppe (14 bis 16) für die gesamte und die freie Clofibrinsäure keine statistisch signifikante Beziehung.

Die Cholesterinkonzentrationen im Plasma (140 - 460 mg / 100 ml) waren mit den Gesamt-CPIB-Werten statistisch nicht mit erforderlicher Sicherheit korreliert. Lediglich in der VLDL-Fraktion (hier 1 - 169 mg / 100 ml) zeigte sich ein statistisch auffälliges Ergebnis ($r = -0,3298$, $p = 0,05$), also ein Abfall des Cholesterins mit steigenden CPIB-Werten. Die absolute und die relative freie Clofibrinsäure waren in keiner Gruppe mit genügend hoher Wahrscheinlichkeit mit den Cholesterinwerten korreliert.

Eine Beziehung zwischen den Phospholipiden und gesamter wie freier Clofibrinsäure konnte weder im Plasma noch in den Lipoproteinfraktionen statistisch nachweisbar festgestellt werden.

Ein Vergleich der Patienten mit normaler Nierenfunktion (Serumkreatinin $\leq 1,2$ mg%) untereinander und zwar zwischen denen ohne Diabetes mellitus (26 Personen) und

latentem wie manifesten Diabetikern (13 Personen) ergab einige interessante Gesichtspunkte. Die durchschnittlichen Gesamt-CPIB-Spiegel waren bei beiden Gruppen ähnlich, für die 43 Seren der Nichtdiabetiker $85,6 \mu\text{g}$, für die 33 Seren der Diabetiker $89,9 \mu\text{g} / \text{ml}$. Die Serum-Triglyzerid-Konzentrationen hatten Mittelwerte von $460 \text{ mg\%}$ bzw. $497 \text{ mg\%}$. Die Mittelwerte unterscheiden sich nach dem U-Test bei Rangaufteilung für nicht verbundene Stichproben nicht signifikant.

Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch mit dem gleichen Test für die prozentualen freien CPIB-Konzentrationen nachweisen ($p = 0,02$). Die Mittelwerte betrugen für die Nichtdiabetiker $1,67 \%$ ($s_x = 0,567$), für die Diabetiker $2,15 \%$ ($s_x = 0,917$). Für diese Differenz scheinen zumindest teilweise die verordneten Pharmaka verantwortlich zu sein. So erhielten 5 der 13 Diabeteskranken die Sulfonylharnstoffe Glibenclamid oder Glibornurid, zwei in Verbindung mit dem Biguanid Buformin. Alle weiteren, therapeutisch wichtigen verordneten Medikamente, wie Mittel gegen Herzinsuffizienz, Angina pectoris, Hypertonie, Hyperuricämie und Diuretika wurden von der "Kontrollgruppe" ebenso eingenommen. Die darüber hinaus von drei Nichtdiabetikern eingenommenen Pyrazolderivate Propyphenazon und Propaphenon sowie das in der Niere wirksame Benzbromaron waren mit überdurchschnittlichen prozentualen CPIB-Werten verbunden, nicht dagegen die Kumarinderivate Acenocoumarol und Phenpro-

coumon und das Furosemid. Inwieweit die diabetische Stoffwechsellaage über die Medikamentenwirkung hinaus einen Einfluß auf die Erhöhung des Mittelwertes hatte, läßt sich aufgrund dieser Studie nicht beurteilen.

Einen Beweis für die toxische Wirkung des freien CPIB-Anteils lieferte ein Einzelfall: Eine 68jährige Frau bekam 2 x 1 g Clofibrat verordnet, alle 12 Stunden 1 g. Nach 60 Stunden mußte die Therapie wegen Übelkeit und Urticaria abgebrochen werden. Die Gesamtspiegel, gemessen vor der Clofibrateinnahme, nach 36 und 60 Stunden, wiesen normale Werte von 122,6 und 125,0 µg / ml Serum auf. Die freie Clofibrinsäure war jedoch exzessiv erhöht auf 11,6 und 22,9 µg / ml, dies sind 9,45 bzw. 17,5 %. Als Ursachen kommen ein erniedrigter Albumingehalt des Serums von 3,99 g%, ein erhöhtes Serumkreatinin von 1,44 mg% und eventuell der bestehende Diabetes mellitus in Frage. Die Transaminasen betrugen 12,7 U / l (GOT) und 22,7 U / l (GPT), die Kreatinkinase 14 U / l.

D i s k u s s i o n

Die vermehrt toxischen Wirkungen vieler stark albumin-gebundener Medikamente bei nierenkranken Patienten wird immer wieder beschrieben. Diese Effekte beruhen auf einem veränderten Bindungsverhalten des Albumins gegenüber sauren Pharmaka. Reidenberg (16) stellte dar, daß Erkrankungen der Niere, besonders die Niereninsuffizienz, eine über die Verminderung der Albuminkonzentration hinausgehende erhöhte Freisetzung von verschiedenen sauren Medikamenten zur Folge haben. Die Anzahl der freien, zur Verfügung stehenden Albuminbindungsstellen scheint durch endogene organische Säuren, die, wie schon erwähnt, an Aktivkohle adsorbieren, nicht aber dialysierbar sind, vermindert zu sein. Gugler (10) forderte deshalb eine Überwachung der Therapie mit stark gebundenen Medikamenten durch Bestimmung des ungebundenen Anteils für die Beurteilung der Gesamtspiegel, da ja der freie Anteil die therapeutischen, aber auch die toxischen Effekte ausmache.

In vitro-Versuche, die die Bindungsverhältnisse für Clofibrat erforschten, liegen von Thorp, W'srand (23) und Beaumont, Dachet (2) vor. Von der Bestimmung der freien Clofibrinsäure im menschlichen Serum berichteten Bridgman (4) bei 4, Gugler (10) bei 6 Patienten. Untersuchungen mit größeren Zahlen liegen hierzu jedoch noch nicht vor.

Die von uns durchgeführte Studie untersuchte die Beziehung der gesamten und der freien CPIB-Konzentrationen im Plasma zu den bei Niereninsuffizienz und nephrotischem Syndrom veränderten Serumwerten an einer größeren Zahl von Patienten, um beschriebene bestehende Zusammenhänge mit menschlichen Blutproben nachzuweisen.

Der prozentuale ungebundene CPIB-Anteil kann je nach der verwendeten Methode etwas unterschiedlich ausfallen. Thorp fand 1962 (23) bei Bindungsversuchen mit Rinderserumalbumin einen freien Anteil von 4 % mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse, Beaumont (2) mit derselben Methode einen von der Gesamtkonzentration stark abhängigen freien Anteil. Die Proteinkonzentration im Versuch war jedoch geringer als im Plasma. Die bei Kontrollpersonen von Bridgman 1972 (4) ultrazentrifugal gewonnenen freien Anteile betrugen zwischen 3,1 und 8,2 %. Wain (24) beobachtete 1976 im Plasma Bindungen von 98 - 99 %. Auch er verwendete die Ultrazentrifuge. Gugler (10) gab 1975 als Normwert 3,6 % freie Säure an, die er durch Gleichgewichtsdialyse erhalten hatte.

Wir untersuchten mit der von uns angewandten, den Serumverhältnissen sehr ähnlichen Art der Gleichgewichtsdialyse mit einem relativ geringen Puffervolumen, unter plasmaisotonen und -isothermen Verhältnissen und bei einem konstanten pH-Wert von 7,4 91 Seren von 48 Patienten und errechneten für Patienten mit normaler Nierenfunktion (Serumkreatinin $\leq 1,2$ mg%) einen Mittelwert von 1,88 %. Dies stimmt mit den zitierten Ergebnissen relativ gut überein.

Die von Beaumont und Dachet beschriebene (2) überproportionale Zunahme des freien Anteils bei steigender Gesamtkonzentration konnte in vitro bestätigt werden, die Gesamtheit der Seren läßt jedoch im therapeutischen Bereich die Annahme einer linearen Beziehung zu.

Wir konnten weiterhin den von Bridgman (4) geäußerten Zusammenhang zwischen der Albuminkonzentration und der Konzentration der freien Clofibrinsäure im Plasma bestätigen. Die Verminderung des Serumalbumins und damit der valenten Bindungsstellen hatte eine Abnahme der gebundenen Clofibrinsäure zur Folge.

Auch die erhöhten ungebundenen CPIB-Anteile bei Zunahme der Serumkreatininwerte, wie wir sie zeigen konnten, stehen im Einklang mit der Literatur, z.B. mit Reidenberg (16). Allerdings waren die Differenzen der ungebundenen Anteile zwischen den Patienten mit Niereninsuffizienz und den Kontrollpersonen nicht so groß. Es konnten wegen des Verbots von Clofibrat allerdings auch nicht so viele Patienten, wie vorgesehen, mit hohen Kreatininwerten untersucht werden.

Die statistisch auffällige Senkung der Triglyzeridwerte bei Zunahme der CPIB-Gesamtspiegel - nicht nur im Einzelfall, sondern bei einem Querschnitt durch ein größeres Kollektiv - zeigt die konzentrationsabhängige Wirkung des Clofibrats, für den ungebundenen Anteil konnte dieser therapeutische Effekt nicht sta-

tistisch gesichert werden.

Weisweiler und Schwandt stellten 1977 (25) fest, daß bei 12 Patienten mit primärer Typ IV - Hyperlipoproteinämie die Anwendung von Clofibrat eine Abnahme der VLDL- und HDL- Cholesterin - Fraktion und einen Anstieg der Cholesterinspiegel in den LDL hervorrief.

Unsere neuen Versuche erbrachten eine negative Korrelation zwischen dem Cholesteringehalt der VLDL und den Gesamt-CPIB-Spiegeln und eine positive Beziehung für die LDL. Der letztere Zusammenhang (LDL), wie auch eine negative Korrelation zwischen den Serum-Cholesterinspiegeln und den CPIB-Gesamtkonzentrationen waren statistisch nicht auffällig.

Dasselbe gilt für die die Gesamt-CPIB-Spiegel und die Phospholipidwerte im Serum. Auch hier war die errechnete negative Korrelation statistisch nicht signifikant, die von Barret und Thorp (1) 1968 an Hunden festgestellt worden war.

Die Erhöhung der ungebundenen Clofibrinsäureanteile bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten kann durch Interaktionen mit anderen eingenommenen Medikamenten erklärt werden. Die zum Beispiel einem Teil dieser Patienten verordneten Sulfonylharnstoffe sind wie die Clofibrinsäure zu einem hohen Prozentsatz an Albumin gebunden. Die Wirkungssteigerung der Sulfonylharnstoffe bei zusätzlicher Clofibrateinnahme ist bekannt (19) und durch Messung des Blutzuckerspiegels erfaßbar. Die

gleichzeitige Beeinflussung der CPIB-Bindung an Albumin durch die Sulfonylharnstoffe ist nach den Gesetzen kompetitiver Vorgänge zu erwarten, hier jedoch aufgrund der geringen Patientenzahl nicht nachzuweisen.

Die angewandte Methode zur Bestimmung der freien Clofibrinsäure im Serum erlaubt auf der Basis der gewonnenen, mit der Literatur übereinstimmenden Ergebnisse die konsequente Überwachung der Therapie von Fettstoffwechselstörungen bei Patienten, für die die Anwendung des Clofibrats mit einem überdurchschnittlichen Risiko verbunden war. Vielleicht ergibt sich für die Zukunft die Möglichkeit, Therapierichtlinien für Patienten mit Nierenkrankheiten zu erstellen.

Bei einem Kurzvortrag über diese Arbeit auf der gemeinsamen Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie am 31. März 1979 in Salzburg (14) wurde auch schon die Frage gestellt, ob die Methode auf ein anderes Hypolipidämikum, das Bezafibrat, angewendet werden könne.

Die Antwort darauf kann eine vielleicht demnächst folgende Untersuchung geben.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde bei insgesamt 91 Serumproben von 48 Patienten geprüft, ob neben dem Gesamtplasmaspiegel die Bestimmung der nicht proteingebundenen Fraktion der Clofibrinsäure eine bessere Kontrollmöglichkeit zur Verhütung von Nebenwirkungen darstellt. Die Serumclofibrinsäure wurde gaschromatographisch bestimmt, die ungebundene Fraktion durch Gleichgewichtsdialyse separiert.

Nach Einnahme von 2 x 1 g Clofibrat pro 24 Stunden wurden nach 3 bis 4 Tagen steady-state-Werte von 104 - 158 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Clofibrinsäure gefunden, ferner eine freie Fraktion von 1,6 - 4,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (dies entspricht 1,6 - 3,3 %).

Während keine Korrelation zwischen Kreatinin (Bereich 0,6 - 13,4 $\text{mg}\%$) und der Gesamtclofibrinsäure bestand ($n = 97$), fanden wir eine Korrelation zur prozentualen freien Clofibrinsäurefraktion ($r = 0,685$, $p = 0,01$, $n = 89$). Weiterhin fanden wir eine negative Korrelation zwischen der Serumalbuminkonzentration und der Konzentration der freien Clofibrinsäure bei einer Medikation von 2 g / 24 Stunden ($r = - 0,499$, $p = 0,01$), entsprechend der erwartbar geringeren Proteinbindung des Pharmakons.

Die Bestimmung der freien Clofibrinsäure stellt somit gegenüber derjenigen der Gesamtkonzentration im Serum

einen verwertbaren Kontrollparameter zur Überwachung der Clofibrattherapie dar.

V e r w e n d e t e C h e m i k a l i e n

1. Clofibrinsäure, Natriumsalz, Tg B 55 / 246, ICI-Pharma, Arzneimittelwerk Plankstadt
2. 2-Naphtoesäure (B), (Naphtalin-2-carbonsäure),
($C_{10}H_7COOH$), MG. 172,19, Fluka AG, Buchs SG
3. HCl, 0,4 n, Apotheke des Klinikums Großhadern
4. Toluol zur Analyse, Art.-Nr. 8325, E. Merck, Darmstadt
5. Trimethylanilinium Hydroxide, 0,2 M in Methanol
(TMAOH), "Meth Elute", Art.-Nr. 49300, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA
6. Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat (prim. Natriumphosphat) zur Analyse, Art.-Nr. 6346, E. Merck, Darmstadt
7. di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (sek. Natriumphosphat) zur Analyse, Art.-Nr. 6580, E. Merck, Darmstadt

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. BARRET, A.M., J.M. THORP

Studies on the mode of action of clofibrate:
Effects on hormon-induced changes in plasma free
fatty acids, cholesterol, phospholipids and total
esterified fatty acids in rats and dogs.
Br. J. Pharmac. Chemother. (1968), 32, 381-391

2. BEAUMONT, J.-L, C. DACHET

Binding to plasma lipoproteins of chlorophenoxy-
isobutyric, tibric, and nicotinic acids and their
esters.
Its significance for the mechanism of lipid
lowering by clofibrate and related drugs.
Atherosclerosis, 25 (1976), 255-266

3. BORGA, O., D.L. AZARNOFF, G.P. FORSHELL, u.a.

Plasma protein binding of tricyclic antidepressants
in man.
Biochemical Pharmacology 18, 2135-2143, 1969

4. BRIDGMAN, J.F., S.M. ROSEN, J.M. THORP

Complications during clofibrate treatment of
nephrotic-syndrome hyperlipoproteinaemia.
Lancet, 1972 II, 506-509

5. CONNOR, J.N., G.F. JOHNSON, H.M. SOLOMON

Qualitative gas-chromatographic flame- ionization
method for p-chlorophenoxyisobutyric acid in
human serum and saliva.
Clinical Chemistry 22, 1976, 884-888

6. COOPER, P.F., G.C. WOOD

Protein-binding of small molecules: new gel filtration method.

J. Pharm. Pharmac. 20, 1505-1565 (1968)

7. DOBBELSTEIN, H., P. SCHWANDT, G. NEUREUTHER, u.a.

Clofibrinsäure-Plasmakonzentration in Abhängigkeit von Nierenfunktion und Serumalbumin.

In: Aktuelle Probleme der Dialyseverfahren und der Niereninsuffizienz, VI. Symposium, Innsbruck, 1977

8. DROMGOOLE, S.H.

The effect of uremia and kidney transplantation on the binding capacity of albumin.

Clinical Chimical Acta, 52 (1974), 301-303

9. GUGLER, R., CH. JENSEN

A rapid gas chromatographic method for the determination of chlorophenoxyisobutyric acid in plasma and urine.

Journal of Chromatography, 117 (1976), 175-179

10. GUGLER, R., D.W. SHOEMAN, D.H. HUFFMAN, u.a.

Pharmacokinetics of drugs in patients with the nephrotic syndrome.

Journal of Clinical Investigation, 55, 1975, 1182-1189

11. HOUIN, G., J.J. THEBAULT, u.a.

A GLC method for estimation of chlorophenoxyisobutyric acid in plasma.

Pharmacokinetics of a single dose of clofibrate
in man.

Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 433-437 (1975)

12. LOWRY, O.H., N. ROSEBROUGH, A.L. FARR, u.a.

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 1951, 265

13. MC QUEEN, E.G., W.M. WARDELL

Drug displacement from protein binding: isolation
of a redistributional drug interaction in vivo.

Br. J. Pharmac. (1971), 43, 312-324

14. MERK, W., J. WILKENING, P. SCHWANDT

Bestimmung der nicht proteingebundenen Clofibrin-
säurefraktion des menschlichen Serums zur Thera-
pieüberwachung.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 17, 181, 1979

15. PETERS, J.P.

Water balance in health and disease.

In: G.G. DUCAN (Hrsg.), Diseases of metabolism,
Philadelphia, 1953

16. REIDENBERG, M.M.

The binding of drugs to plasma proteins from
patients with poor renal function.

Clinical Pharmacokinetics 1: 121-125 (1976)

17. REIDENBERG, M.M., M. AFFRIME

Influence of disease on binding of drugs to

plasma proteins.

Ann. NY. Acad. Sci. 226, 1973, 115-126

18. SACHS, I.

Angewandte Statistik.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 4.

Auflage, 1974, 235-236

19. SCHWANDT, P.

Hypolipidämika - Wechselwirkungen mit anderen
Medikamenten.

Med. Mo. Pharm., Heft 6, 1979

20. SHOEMAN, D.W., D.L. AZARNOFF

The alteration of plasma proteins in uremia as
reflected in their ability to bind digitoxin
and diphenylhydantoin.

Pharmacology 7, 169-177 (1972)

21. SPECTOR, R., R. VERNICK, A.V. LORENZO

Effects of pressure on the plasma binding of
digoxin and ouabain in an ultrafiltration apparatus.

Biochemical Pharmacology 22, 1973, 2485-2487

22. THORP, J.M.

Determination of "Atromid S" in urine and serum.

ICI Pharmaceuticals, 1963

23. THORP, J.M., B.SC. W`SRAND

Experimental evaluation of an orally active
combination of androsterone with ethyl chloro-
phenoxyisobutyrate.

Lancet, 1962 I, 1323-6

24. WAIN, J.S.

Methode und Ergebnisse nicht veröffentlicht.
ICI Pharmaceutical Division, 1976

25. WEISWEILER, P., P. SCHWANDT

Lipoproteinveränderungen unter Clofibrat bei Typ
IV - Hyperlipoproteinämien.
Klin. Wschr. 55, 791-794 (1977)

Lebenslauf

Am 11. 3. 1955 wurde ich als Sohn des Richters Kurt Merk und seiner Ehefrau Erika, geb. Goes, in München geboren.

1974 legte ich das Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlichen Erasmus Grasser Gymnasium München ab.

Von 1974 bis 1980 studierte ich an der Ludwig Maximilians-Universität München Humanmedizin.

Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich 1976, den 1., 2. und 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in den Jahren 1977, 1979 und 1980.

Die Approbation wurde mir im Dezember 1980 erteilt.

